



THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Laboratoire de neurosciences expérimentales et cliniques - LNEC
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges)
Secteur de recherche : Neurosciences

Présentée par :
Sophie Péron

Évaluation du potentiel thérapeutique des stratégies de remplacement cellulaire dans un modèle de lésion corticale chez la souris : transplantation neuronale et mobilisation des cellules souches endogènes

Directeur(s) de Thèse :
Afsaneh Gaillard

Soutenue le 05 février 2013 devant le jury

Jury :

Président	Thierry Hauet	Professeur des Universités, praticien hosp., Université de Poitiers
Rapporteur	Christine Métin	Chargée de recherche, INSERM, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6
Rapporteur	Stephen Dunnett	Professor, Cardiff University, Royaume-Uni
Membre	Afsaneh Gaillard	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Membre	Mohamed Jaber	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Membre	Harold Cremer	Directeur de recherche, CNRS, Université de Marseille

Pour citer cette thèse :

Sophie Péron. *Évaluation du potentiel thérapeutique des stratégies de remplacement cellulaire dans un modèle de lésion corticale chez la souris : transplantation neuronale et mobilisation des cellules souches endogènes* [En ligne]. Thèse Neurosciences. Poitiers : Université de Poitiers, 2013. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

THESE

pour l'obtention du Grade de

Docteur de l'Université de Poitiers

Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées

(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : Biosanté n°524

Secteur de Recherche : **Neurosciences**

Présentée par :

Sophie Péron

Evaluation du potentiel thérapeutique des stratégies de remplacement cellulaire
dans un modèle de lésion corticale chez la souris : transplantation neuronale et
mobilisation des cellules souches endogènes

Directeur de Thèse : Afsaneh Gaillard

Soutenue le 5 février 2013

devant la Commission d'Examen

JURY

Pr. Dunnett Stephen (Université de Cardiff).....	Rapporteur
Dr. Métin Christine (Université Pierre et Marie Curie, Paris).....	Rapporteur
Dr. Harold Cremer (Université de Marseille-Luminy).....	Examinateur
Pr. Hauet Thierry (Université de Poitiers).....	Examinateur
Pr. Jaber Mohamed (Université de Poitiers).....	Examinateur
Pr. Gaillard Afsaneh (Université de Poitiers).....	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer tous mes remerciements aux membres du jury : merci au Professeur Stephen Dunnott et au Docteur Christine Métin d'avoir accepté d'évaluer cette thèse en tant que rapporteurs ainsi qu'au Professeur Thierry Hauet et au Docteur Harold Cremer d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je remercie le Professeur Mohamed Jaber pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, m'ayant ainsi offert un environnement enrichissant pour la réalisation de cette thèse. Merci également au Professeur Afsaneh Gaillard. Au-delà des remerciements formels que tout thésard doit à son encadrant, j'ai pleinement conscience de la chance que j'ai eue d'effectuer cette thèse à vos côtés, tant pour vos qualités scientifiques et les conditions de travail dont vous m'avez fait profiter que pour les qualités humaines avec lesquelles vous m'avez encadrée. Je souhaite à tout doctorant de pourvoir réaliser sa thèse dans les conditions et l'environnement dans lesquels j'ai effectué la mienne.

J'ai commencé les neurosciences pendant mon stage de M2, encadrée par le Professeur Joël Paquereau. Joël, je tiens à te remercier ici pour cette initiation à l'électrophysiologie, pour toutes les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir et pour tous les conseils que tu as pu me donner.

Merci aux scientifiques de l'Institut de Biologie du Développement de Marseille-Luminy et de l'Institut pour la Recherche Interdisciplinaire de l'Université Libre de Bruxelles avec lesquels j'ai eu la chance de collaborer.

Pour ces trois belles années passées avec vous, merci à tous les membres du LNEC. Merci à Marianne Benoît-Marand pour cette première année passée à travailler avec toi. Un grand merci à Isabelle Frappé pour tous tes conseils scientifiques et toutes les discussions partagées avec toi. Thanks a lot Bhaskar for all those nice moments spent with you and all the advices you gave me. Merci à Marcello Solinas pour tes précieux conseils en statistiques et à tous ceux qui m'ont aidée et conseillée pour la réalisation de cette thèse.

Merci à tous les doctorants, Joëlle, Céline, Clément, Nathalie, Marine et aux techniciennes, Virginie, Maureen, et bien sûr, à « ma technicienne préférée ». Merci pour votre aide au quotidien, et pour tous les bons moments passés avec vous qui vont me manquer.

Merci à Anne Cantereau pour ton aide en microscopie confocale.

Merci également à toutes les personnes qui ont facilité cette thèse par l'aide qu'elles m'ont apportée dans les démarches administratives, dans le soin porté à mes souris à l'animalerie, pour l'organisation des TP.

Collègue, mais surtout amie, merci à toi, Rania. Ces trois années n'auraient pas été pareilles sans toi. Toi qui m'as devancée de quelques mois, je te souhaite tout le meilleur dans ta vie professionnelle et personnelle.

En ce qui concerne mes proches, par pudeur, et pour éviter aux lecteurs des pages d'anecdotes qui ne leur rappellent rien, je prendrais le temps de vous remercier en d'autres occasions. Merci pour tout votre soutien, mais j'en aurais encore besoin, car la fin de cette thèse, plus qu'un aboutissement, marque le début d'une nouvelle aventure.

Je prendrais tout de même quelques lignes pour remercier ici ma famille qui m'a soutenue depuis le début. A mes parents et grands-parents qui m'ont vu grandir, ont éveillé ma curiosité sur tant de choses avant que je ne choisisse de me lancer dans la recherche, et m'ont soutenue pendant ces 26 années. A mes soeur et frères, Myriam, Alexandre et Florian.

Merci à tous les obstacles et galères qui m'ont fait grandir et m'ont poussée à vouloir toujours aller plus loin.

Enfin, et surtout, au-delà des remerciements pour toi Ahmadou, je tiens à t'exprimer ici toute la fierté que je porte à être ta maman et tout le bonheur que je ressens à te voir grandir chaque jour. Je te souhaite le bel avenir que tu mérites, et serai toujours à tes côtés pour t'aider à toi aussi aller jusqu'au bout de tes projets.

A Ahmadou,

pour qui mon amour de maman est immense

Résumé

Les lésions cérébrales induisent une mort neuronale associée à des déficits fonctionnels importants. Afin de pallier aux capacités limitées de régénération spontanée des neurones du système nerveux central adulte, nous avons évalué, dans un modèle de lésion par aspiration du cortex moteur chez la souris adulte, le potentiel de stratégies de remplacement cellulaire par la transplantation de neurones embryonnaires ou dérivés de cellules souches, et la mobilisation des cellules souches endogènes présentes dans la zone sous-ventriculaire (SVZ). L'efficacité des neurones greffés dépend de leur capacité à adopter un phénotype neuronal approprié et à établir des projections spécifiques vers l'hôte. Nous avons montré que les cellules embryonnaires transplantées immédiatement après la lésion dans le cortex moteur lésé se différencient en neurones matures corticaux et envoient des projections appropriées vers les cibles du cortex moteur. Nous avons montré qu'introduire un délai d'une semaine entre la lésion du cortex moteur et la transplantation augmente la vascularisation et la prolifération des cellules transplantées, ainsi que la densité des projections qu'elles développent. Par ailleurs, nous avons étudié la possibilité de générer des neurones corticaux à partir de cellules souches humaines comme source alternative de neurones à transplanter. Enfin, nous avons montré que la lésion du cortex moteur induit une augmentation de la prolifération cellulaire et de la neurogenèse dans la SVZ, et favorise la migration des neuroblastes de la SVZ vers le site de lésion.

Abstract

Damage to the adult motor cortex can lead to severe deficits in motor function. One strategy for overcoming the generally limited capacity of the mature central nervous system to regenerate axons in response to cell loss is cell replacement based therapies. We studied brain repair strategies in a mouse model of motor cortex aspiration lesion by using transplantation of embryonic neurons or stem cells-derived neurons and by evaluating the potential of endogenous stem cells found in the subventricular zone (SVZ). Neuronal transplantation efficacy depends on the capacity of the transplanted cells to develop into appropriate neuronal phenotype and establishment of specific connections. We have shown that embryonic cells grafted immediately after lesion into the lesioned motor cortex develop into mature neurons with appropriate phenotype and establish projections towards appropriate targets. We have shown that introducing a delay of one week between motor cortex lesion and transplantation enhances graft vascularization, grafted cells proliferation and the density of transplant-to-host projections. Besides, we have studied the possibility to generate cortical neurons from human stem cells as an alternative source of neurons for transplantation. Finally, recruitment of endogenous stem cells found in the SVZ was examined in a mouse model of cortical lesion. We have shown that motor cortex injury increases cellular proliferation and neurogenesis in the SVZ and the migration of neuroblasts near the lesion site via blood vessels and astrocytes assisted migration.

SOMMAIRE GENERAL

PRINCIPALES ABREVIATIONS

INDEX DES FIGURES

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION

I. Le cortex cérébral.....	1
A. Généralités sur l'organisation du cortex cérébral	1
1. Les couches corticales	1
2. Organisation en colonnes	2
3. Composition cellulaire du cortex cérébral.....	3
B. La corticogenèse.....	5
1. Généralités sur l'origine des neurones corticaux	5
2. Migration des neurones corticaux.....	9
3. Facteurs influençant la spécification spatiale et temporelle des neurones corticaux	9
4. Identité des progéniteurs neuraux	12
5. Diversification cellulaire	14
6. Particularités du cortex humain	17
C. Le cortex moteur et ses connexions	18
1. Organisation du cortex moteur	18
2. Connexions corticales.....	20
D. Lésion du cortex moteur	25
1. Modèles animaux de lésion corticale	25
2. Lésion du cortex moteur : considérations fonctionnelles	26
II. Réparation cérébrale par transplantation neuronale.....	29
A. Rappels historiques	29
1. Les débuts (1890-1940).....	29
2. L'ère pré-moderne (1940-1970)	30
3. L'ère moderne (depuis 1970)	31
B. Transplantation de neurones embryonnaires corticaux	31
1. Chez le nouveau-né	31
2. Chez l'adulte	35
3. Composition cellulaire et organisation cytoarchitecturale des transplants.....	40
4. Facteurs influençant le développement des neurones transplantés	41
C. Transplantation de neurones dérivés de cellules souches	47
1. Généralités sur les cellules souches	47
2. Génération et transplantation de neurones corticaux à partir de cellules souches.....	50
III. La neurogenèse chez l'adulte et ses potentielles applications à la réparation cérébrale	55
A. Généralités sur la neurogenèse adulte	55
B. Le système SVZ-RMS-OB	57
1. Généralités	57
2. Organisation et composition cellulaire de la SVZ	59

3. Migration des cellules originaires de la SVZ	62
4. Particularités de la neurogenèse secondaire humaine.....	64
5. Régulation de la neurogenèse.....	66
C. Mobilisation des cellules souches endogènes de la SVZ en conditions pathologiques	71
1. Prolifération cellulaire et neurogenèse après lésion corticale.....	71
2. Migration des neuroblastes vers le site de lésion.....	73
3. Survie et différenciation des cellules originaires de la SVZ.....	74
4. Facteurs impliqués dans le recrutement des neuroblastes de la SVZ en conditions pathologiques.....	75
5. Relevance fonctionnelle de la mobilisation des cellules souches endogènes ...	76

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Article 1: Développement et maturation dans le temps des neurones embryonnaires corticaux et de leurs projections axonales après transplantation dans le cortex moteur lésé adulte.

Article 2 : Influence d'un délai entre la lésion corticale et la transplantation sur la vascularisation et le développement des cellules transplantées d'un point de vue anatomique et fonctionnel.

Article 3 : La corticogenèse à partir de cellules souches pluripotentes humaines permet la génération de neurones pyramidaux présentant des propriétés hodologiques diverses et complexes.

Article 4 : La lésion corticale chez l'adulte stimule la prolifération des progéniteurs neuraux de la SVZ et leur migration vers le site de lésion.

DISCUSSION

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

PRINCIPALES ABREVIATIONS

Ang1 : angiopoietin 1	GMFB : glia maturation factor beta
ARNm : acide ribonucléique messager	hESCs : human embryonic stem cells
BDNF : brain-derived neurotrophic factor	hNSCs : human neural stem cells
BLBP : brain lipid binding protein	IPSCs : induced pluripotent stem cells
BMP : bone morphogenetic factors	LGE : lateral ganglionic eminence
CFL : caudal forelimb area	Lhx2 : LIM homeobox protein 2
CGE : caudal ganglionic eminence	MAG : myelin-associated glycoprotein
CNS : central nervous system	MCAO : middle cerebral artery occlusion
CPu : caudate putamen	mESCs : mouse embryonic stem cells
Ctip2 : chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting protein 2	MGE : medial ganglionic eminence
Cux1 : cut-like homeobox 1	NGF : nerve growth factor
Cux2 : cut-like homeobox 2	NMDA : acide N-methyl-D-aspartique
DCX : doublecortin	NSCs : neural stem cells
EGF : epidermal growth factor	OB : olfactory bulb
Emx2 : empty spiracles homeobox 2	OMgp : oligodendrocyte-myelin glycoprotein
Epo : erythropoietin	Pax6 : paired box protein 6
ESCs : embryonic stem cells	PEDF : pigment epithelium-derived factor
Fezf2 : forebrain embryonic zinc finger-like protein 2	PSA-NCAM : poly-sialated neural cell adhesion molecule
FGF : fibroblast growth factor	RFL : rostral forelimb area
FoxG1 : forkhead box protein G1	RMS : rostral migratory stream
GABA : acide γ -aminobutyrique	SDF-1 : stromal derived factor 1
GCL : granular cell layer	SGZ : subgranular zone
GDNF : glial cell line-derived neurotrophic factor	Shh : sonic hedgehog
GFAP : glial fibrillary acidic protein	Sox5 : SRY-related HMG-box5
GFP : green fluorescent protein	Svet1 : subventricular-expressed transcript 1
GLAST : glutamate aspartate transporter	SVZ : subventricular zone
	TBI : traumatic brain injury

TH : tyrosine hydroxylase

VEGF : vascular endothelial growth factor

V-GLUT1 : vesicular glutamate transporter 1

VZ : ventricular zone

2-DG : 2-deoxyglucose

INDEX DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Organisation laminaire du cortex	3
<u>Figure 2</u> : Génération des neurones corticaux à projection chez la souris selon un profil « Inside-out »	7
<u>Figure 3</u> : Mécanismes d'induction neurale et de spécification corticale pendant la corticogenèse.....	11
<u>Figure 4</u> : Identité des progéniteurs corticaux neurogéniques pendant le développement.	13
<u>Figure 5</u> : Profils d'expression génique embryonnaire et postnatal murins des neurones à projection corticaux générés séquentiellement pendant la corticogenèse	15
<u>Figure 6</u> : Représentation schématique de l'organisation du cortex moteur primaire chez la souris définie à partir d'expériences de microstimulation intracorticale.	19
<u>Figure 7</u> : Représentation des principaux systèmes de projections du cortex moteur.	24
<u>Figure 8</u> : Reconstruction anatomique des voies lésées après transplantation du cortex moteur embryonnaire dans le cortex moteur lésé chez la souris adulte.	39
<u>Figure 9</u> : Origine des cellules souches permettant la génération de cellules neurales.	47
<u>Figure 10</u> : Déterminisme neural par transdifférenciation ou après reprogrammation.....	49
<u>Figure 11</u> : La neurogenèse adulte chez les mammifères est constitutive dans deux niches neurogéniques principales.....	56
<u>Figure 12</u> : Génération des interneurones bulbaires par les cellules souches de la SVZ.....	58
<u>Figure 13</u> : Cytoarchitecture de la SVZ.....	61
<u>Figure 14</u> : Organisation de la SVZ humaine dans le plan coronal.	65
<u>Figure 15</u> : Régulation de la neurogenèse dans la SVZ.....	70

AVANT-PROPOS

Diverses conditions pathologiques d'origines traumatiques ou neurodégénératives peuvent entraîner des lésions cérébrales associées à une mort cellulaire et entraînant des déficits fonctionnels.

Durant ma thèse, je me suis intéressée aux mécanismes de réparation cérébrale dans un modèle de lésion corticale chez la souris. Plus précisément, nous avons exploré le potentiel de stratégies de remplacement cellulaire : d'une part, par la transplantation de neurones corticaux embryonnaires ou de neurones corticaux dérivés de cellules souches ; et d'autre part, par la mobilisation des cellules souches endogènes présentes au sein du système nerveux central adulte.

Aussi, en introduction de ce travail, après une description générale de l'organisation du cortex et des principales étapes de sa mise en place pendant le développement, je présenterai un état de l'art des résultats obtenus dans le domaine de la transplantation de neurones corticaux. Enfin, je reviendrai sur le potentiel thérapeutique des cellules souches endogènes.

Le travail réalisé pendant ma thèse a mené à quatre articles en préparation ou soumis dans des revues scientifiques à comité de lecture.

Les deux premières études ont été réalisées dans un modèle de transplantation de neurones corticaux embryonnaires chez l'adulte après lésion par aspiration unilatérale du cortex moteur. L'utilisation de ce modèle a permis récemment de mettre en évidence les capacités insoupçonnées de repousse axonale et de réparation anatomique des voies lésées par les neurones transplantés au sein du système nerveux central mature. En tirant avantage de l'utilisation d'embryons surexprimant la protéine fluorescente verte (GFP), il a en effet été démontré dans ce modèle que les neurones greffés émettaient des projections vers les cibles corticales et sous corticales appropriées, y compris à longue distance vers la moelle épinière, permettant ainsi une reconstruction point-à-point des voies motrices lésées. De plus, ces fibres sont myélinisées, et les neurones transplantés établissent des contacts synaptiques avec l'hôte (Gaillard et al., 2007).

L'efficacité de la transplantation neuronale dépend fortement de la capacité des cellules transplantées à adopter un phénotype cellulaire approprié et à mettre en place des connexions spécifiques. L'objectif de la première étude était donc (1) d'étudier la composition cellulaire des transplants (2) d'analyser dans le temps la

maturation des neurones embryonnaires transplantées et les projections qu'ils développent vers les cibles du cortex moteur.

Par ailleurs, la survie des cellules transplantées dépend de l'apport en oxygène et en composés métaboliques qu'elles reçoivent via le réseau vasculaire. Il a été suggéré qu'introduire un délai entre la lésion et la transplantation permettrait la libération de facteurs trophiques, la diminution des niveaux de facteurs neurotoxiques et le développement de la vascularisation, et favoriserait ainsi la survie des transplants (Nieto-Sampedro et al., 1983, Gibbs et Cotman, 1987 ; Gonzalez et Sharp, 1987 ; Grabowski et al., 1994). Nous avons, dans notre seconde étude, analysé l'influence d'un délai entre la lésion et la transplantation sur le développement et la vascularisation des neurones transplantés. Ainsi, nous avons étudié l'influence d'un délai sur (1) le développement spatio-temporel de la vascularisation et des projections développées par les neurones transplantés à différents temps *in vivo* et *post-mortem* (2) la prolifération cellulaire et la survie des neurones greffés à différents temps *post-mortem* (3) la récupération à long terme des fonctions motrices affectées par la lésion.

L'utilisation thérapeutique de neurones embryonnaires souffrant de limites notamment éthiques et logistiques, nous avons par ailleurs évalué le potentiel de sources alternatives de cellules que représentent les cellules souches. Une étude récente à laquelle a contribué notre équipe a démontré la possibilité, par un procédé étonnamment simple, de générer des neurones corticaux à partir de cellules souches embryonnaires de souris. Cette corticogenèse *in vitro* présente des similitudes majeures avec celle s'établissant durant le développement cortical ; et les neurones ainsi générés sont capables de s'intégrer aux réseaux neuronaux *in vivo* après transplantation selon un profil spécifique (Gaspard et al., 2008). De plus, la découverte récente de la possibilité d'inverser l'horloge cellulaire en reprogrammant des cellules somatiques humaines en cellules souches pluripotentes (Takahashi et Yamanaka, 2006) offre de nouvelles perspectives dans les domaines de modélisation développementale ou pathologique et de réparation cérébrale par thérapie cellulaire. Nous avons donc étudié dans notre troisième étude les mécanismes de corticogenèse *in vitro* à partir de cellules souches humaines embryonnaires et

induites et analysé leur développement *in vivo* après transplantation dans le cortex moteur chez la souris nouveau-né.

Par ailleurs, nous savons depuis quelques décennies maintenant que des événements neurogéniques persistent de manière continue dans certaines zones du cerveau adulte. Cette neurogenèse secondaire suscite l'intérêt de la communauté scientifique ; utiliser cette source de cellules pour remplacer les neurones détruits en conditions pathologiques représente une solution alternative ou complémentaire à la transplantation neuronale. Nous avons donc évalué dans notre dernière étude la prolifération des cellules souches endogènes de la zone sous ventriculaire suite à une lésion corticale par aspiration, et étudié leur mode de migration jusqu'au site de lésion.

INTRODUCTION

I. Le cortex cérébral

Le cortex cérébral chez l'adulte est organisé en un grand nombre d'aires distinctes qui diffèrent par leur architecture cellulaire, leurs connexions et leurs propriétés physiologiques.

Ce chapitre expose des éléments de prolifération, migration et différenciation des neurones corticaux.

A. Généralités sur l'organisation du cortex cérébral

Le néocortex est la partie la plus externe des hémisphères cérébraux (jusqu'à 4,5 mm d'épaisseur chez l'humain). Il est impliqué dans les fonctions cognitives supérieures telles que la conscience, le langage, la perception sensorielle, le raisonnement spatial ou encore les commandes motrices volontaires.

Il est composé de nombreuses aires associées à différentes fonctions, et présente une organisation laminaire (en couches) et verticale (en colonnes).

1. Les couches corticales

Les techniques de coloration, telles que les colorations de Nissl ou de Golgi, permettent de visualiser les cellules du cerveau. Elles ont permis, il y a plus d'un siècle, en se basant sur des différences cytoarchitecturales (taille, type et densité cellulaire), d'identifier 6 couches laminaires dans le cortex chez le primate, et de délimiter plus de 40 aires corticales (Brodmann, 1905).

Les couches corticales sont numérotées de I à VI à partir de la surface corticale (Figure 1). La couche I (couche moléculaire) contient principalement des fibres nerveuses orientées horizontalement et des cellules gliales mais aussi quelques cellules de Cajal-Retzius et neurones étoilés. La couche II (couche granulaire externe) est constituée de neurones granulaires de petite taille. Elle reçoit les afférences provenant des autres zones du cortex cérébral (afférences cortico-corticales). La couche III (couche pyramidale externe) est formée de cellules pyramidales qui envoient principalement des projections cortico-corticales. La couche IV (couche granulaire interne) est constituée de neurones étoilés et pyramidaux. Elle reçoit des afférences sous corticales, et du cortex contralatéral. La couche V (couche pyramidale interne) contient de larges neurones pyramidaux ou neurones à projection, qui émettent des projections vers des cibles sous corticales ou corticales. La couche VI (couche polymorphe) contient des cellules pyramidales qui projettent vers le thalamus.

2. Organisation en colonnes

En 1957, Vernon Benjamin Mountcastle étudie la réponse des cellules du cortex somatosensoriel suite à leur stimulation électrique. Lorente de Nò avait déjà décrit quelques années plus tôt les « cylindres verticaux » corticaux, mais c'est Mountcastle qui introduit en premier le concept d'organisation en colonnes du cortex cérébral (Mountcastle, 1957). Il propose alors que chaque colonne corticale, d'un diamètre d'environ 250 à 500 µm, et s'étendant de la couche II à la couche VI, forme une unité anatomique et fonctionnelle élémentaire du cortex. Chaque colonne est elle-même formée de plusieurs mini-colonnes, liées entre elles par des connexions horizontales, et définies comme les plus petites unités d'organisation du cortex. Elles mesurent de 40 à 50 µm de largeur et contiennent chacune une centaine de neurones (Bukhoeveden et Casanova, 2002). D'un point de vue fonctionnel, les cellules qui composent une mini-colonne, partagent des propriétés de réponse.

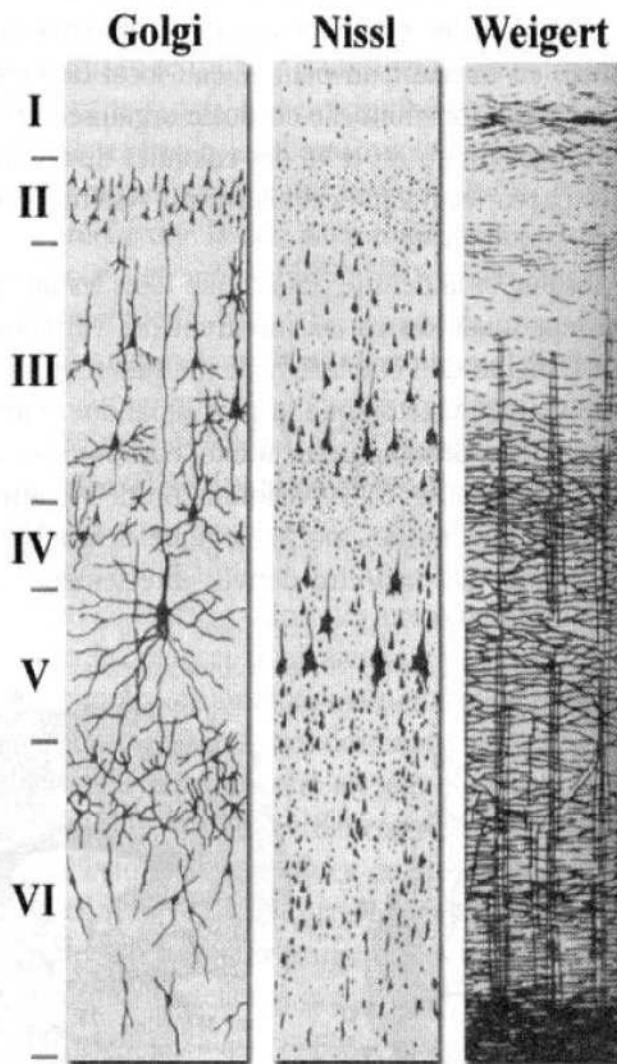


Figure 1: Organisation laminaire du cortex. Les 6 couches corticales sont délimitées selon 3 colorations (Golgi, Nissl et Weigert). (*D'après Houdé et al., 2002*).

3. Composition cellulaire du cortex cérébral

a) Composante neuronale

Le cortex cérébral est composé en grande majorité (environ 80%) de neurones pyramidaux. D'un point de vue morphologique, les neurones pyramidaux corticaux ont un corps cellulaire de forme triangulaire et possèdent une large dendrite apicale orientée radialement vers la surface du cortex. Les neurones

pyramidaux sont de type excitateur et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. Leurs dendrites possèdent de nombreuses épines dendritiques où s'établissent des contacts synaptiques. Ils sont particulièrement nombreux dans les couches II/III, V et VI, et sont absents de la couche I. Les neurones pyramidaux émettent des projections vers les cibles corticales et sous corticales du cortex cérébral.

Le cortex cérébral contient également environ 20% de cellules non-pyramidales, à corps cellulaire ellipsoïdal, et qui en général n'ont pas de dendrite proéminente. Ces neurones ont des axones courts projetant localement, d'où leur nom d'interneurones. Ils sont inhibiteurs et utilisent comme neurotransmetteur l'acide γ -aminobutyrique (GABA). Ils ne constituent pas une population homogène, et des tentatives de classification ont été réalisées sur la base de critères morphologiques, électrophysiologiques et d'expression génique (Peters et Regidor, 1981 ; Kawaguchi et Kubota, 1996 ; Cauli et al., 1997 ; Gupta et al., 2000).

b) *Cellules gliales*

On regroupe sous le terme de cellules gliales les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules de Schwann, et la microglie. Les cellules gliales sont largement représentées dans le cerveau puisqu'elles occupent 50% du volume cérébral et représentent près de 90% du nombre de cellules présentes dans le cerveau. La microglie est constituée de macrophages résidents activés en réponse à une atteinte du SNC, formant ainsi son principal système de défense immunitaire. La microglie est représentée par les astrocytes et oligodendrocytes. Les astrocytes ont généralement une forme étoilée et sont en contact, par leurs prolongements, avec les vaisseaux sanguins, la pie-mère et les neurones. Ils assurent notamment un rôle de soutien, de nutrition et de protection auprès des neurones. Les oligodendrocytes jouent un rôle primordial dans la myélinisation des axones du SNC (la myélinisation des axones du système nerveux périphérique étant assurée par les cellules de Schwann) qui améliore la conduction de l'influx nerveux. Cependant, le rôle des cellules gliales ne se limite pas à ces seules fonctions ; nous savons maintenant que dans certains cas, elles participent activement, de concert avec les neurones, à la transmission de signaux électriques et chimiques (Perea et Araque, 2007).

B. La corticogenèse

1. Généralités sur l'origine des neurones corticaux

Pendant le développement, les cellules destinées à constituer les organes naissent le plus souvent près de leur localisation finale. A l'inverse, dans le cas du développement du cortex cérébral, les cellules sont générées à distance, puis migrent afin de lui donner naissance (pour revue, Kriegstein et Noctor, 2004).

Chez les mammifères, pendant le développement embryonnaire (dès la première moitié de la gestation), le CNS se forme dans le tube neural et plus précisément dans sa partie antérieure pour ce qui est du cortex cérébral. Le tube neural se forme par invagination de la plaque neurale, dont les bords convergent puis fusionnent (Bystron et al., 2006). Des cellules souches neurales bordant le tube neural forment l'épithélium de la zone ventriculaire (VZ) qui borde les ventricules. Pendant le processus de corticogenèse, une seconde zone proliférative apparaît : la zone sous ventriculaire (SVZ). Les cellules souches neurales se multiplient, d'abord par divisions symétriques (pour accroître le nombre de progéniteurs), puis asymétriques (pour donner naissance à des neurones) (Noctor et al., 2004). Les premières cellules à quitter la VZ forment la pré-plaque, qui se divise ensuite pour donner la sous-plaque et la zone marginale (composée par les cellules de Cajal-Retzius). Puis, peu après leurs dernières divisions mitotiques, les neuroblastes migrent vers la surface piale du cortex où ils forment la plaque corticale (cortex immature). Chaque génération successive de neurones passe devant la précédente pour arriver à destination, à l'interface entre la sous-plaque corticale et la zone marginale (Rakic et Lombroso, 1998). Ainsi, le cortex cérébral se forme selon un profil « inside-out », où les neurones générés en premier se retrouvent dans les couches profondes, et les neurones générés en dernier forment les couches les plus superficielles (Rakic et Lombroso, 1998). La sous-plaque disparaîtra peu après la naissance, tandis que la zone marginale deviendra la couche I du néocortex.

Une fois en place, les neurones établissent leurs connexions synaptiques (Rakic et Lombroso, 1998), spécifiques, selon le type neuronal et la topographie.

Les cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes) du cortex se forment de la même manière que les neurones, mais avec des progéniteurs différents.

Chez la souris, la corticogenèse se déroule entre le 10^e (E10,5) et le 15^e (E15,5) jour de vie embryonnaire (Figure 2).

Différentes hypothèses ont été émises pour comprendre la manière dont se met en place l'organisation des neurones corticaux.

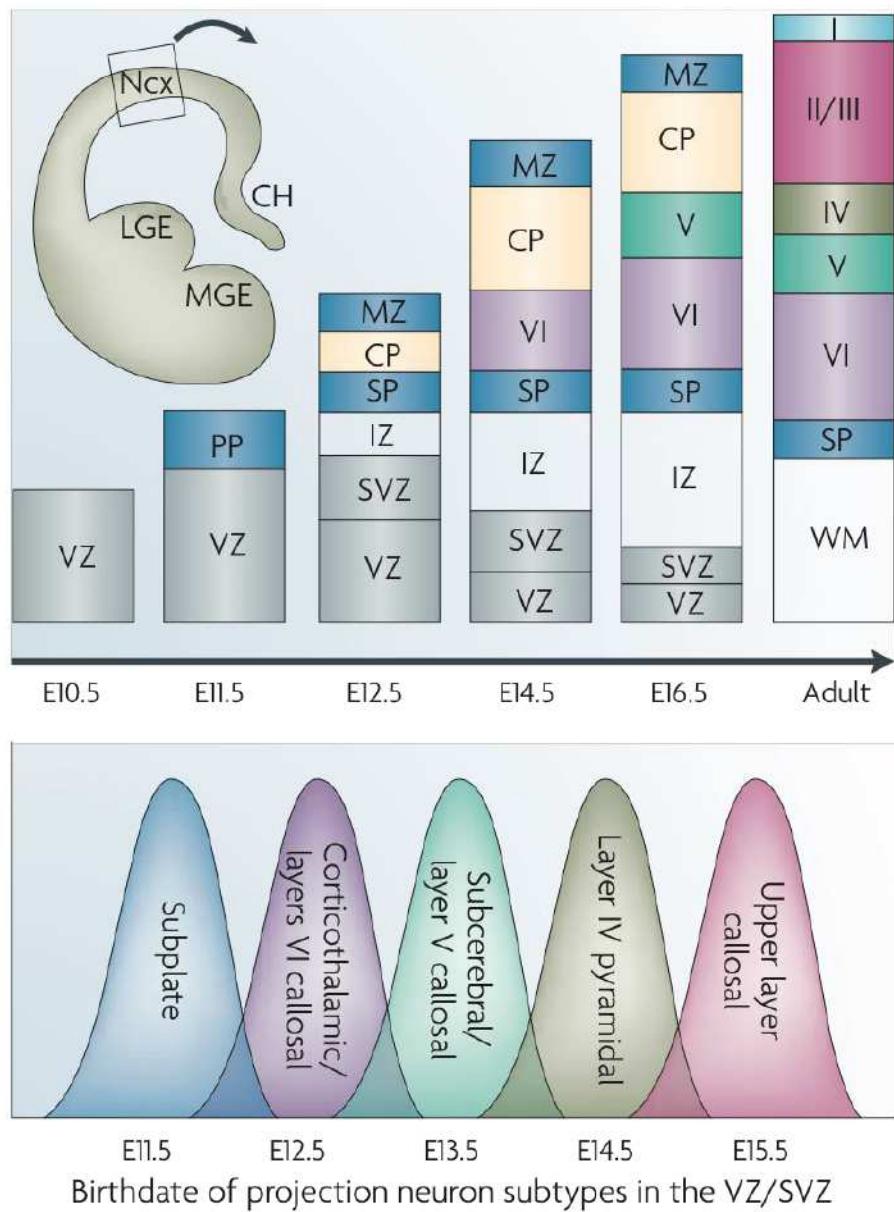


Figure 2 : Génération des neurones corticaux à projection chez la souris selon un profil « Inside-out ». Les premiers neurones générés forment la pré-plaque (PP) qui est par la suite scindée en deux : la zone marginale (MZ) superficielle qui deviendra la couche 1 du néocortex, et la sous-plaque (SP) profonde qui disparaîtra peu après la naissance. Entre ces deux couches arriveront les générations successives de neurones corticaux : d'abord les neurones des couches profondes, puis ceux des couches plus superficielles. CH, ourlet cortical ; E, jour de vie embryonnaire ; Ncx, néocortex ; LGE, éminence ganglionnaire latérale ; MGE, éminence ganglionnaire médiane ; IZ, zone intermédiaire ; SVZ, zone sous-ventriculaire ; VZ, zone ventriculaire ; WM, matière blanche. (D'après Molyneaux *et al.*, 2007).

- La « Radial unit hypothesis »

Selon la « radial unit hypothesis » développée par Pasko Rakic (Rakic, 1988), les coordonnées tangentielles (horizontales) des neurones corticaux sont déterminées par la position relative de leurs précurseurs dans la VZ. En effet, la VZ est divisée en colonnes de précurseurs appelées « unités prolifératives » (proliferative units). Lors de leur migration, les cellules d'une même unité proliférative migrent successivement suivant le même « guide de la glie radiaire » (RG), et se placent ainsi dans la même colonne ontogénétique (Rakic, 1988).

Leur position radiale, définie selon le processus « inside-out », reflète quant à elle leur origine dans le temps (Rakic, 1988).

- L'hypothèse du protomap

Cette hypothèse, également développée par Pasko Rakic, propose un modèle de développement cortical basé sur l'existence précoce d'une carte des territoires corticaux adultes (Rakic, 1988). Son fondement principal est le transfert fidèle d'informations de la VZ vers la plaque corticale où se différencient les neurones, grâce à la migration radiaire des neurones postmitotiques.

- L'hypothèse du protocortex

L'hypothèse du protomap est souvent opposée à l'hypothèse du protocortex (Creutzfeld, 1977) qui propose qu'au sein du télencéphale dorsal apparemment homogène et uniforme comparé à l'isocortex adulte, tous les neurones corticaux ont initialement le même potentiel. Cette interprétation a conduit à envisager l'isocortex comme un « protocortex », dépourvu de signes d'organisation interne tant que des instructions épigénétiques ne lui sont pas parvenues. Les aires corticales s'individualiseraient tardivement sous l'influence de signaux externes, plus particulièrement des afférences thalamiques (O'Leary, 1989 ; Schlaggar et O'Leary, 1991).

2. Migration des neurones corticaux

Après leur naissance dans la VZ, les neurones migrent en direction du cortex cérébral.

En fonction du type neuronal, le processus de migration est différent. Ainsi, les neurones corticaux pyramidaux, originaires du télencéphale dorsal (Hatanaka et Murakami, 2002), utilisent une migration radiaire (migration verticale, en association avec la glie radiaire) relativement directe. A l'inverse, la plupart des interneurones corticaux, originaires du télencéphale ventral (Lavdas et al., 1999), ont une migration plus longue et moins directe (pour revue, Kriegstein et Noctor, 2004). La plupart de ces derniers sont générés dans l'éminence ganglionnaire médiane du télencéphale ventral, entrent dans le télencéphale dorsal, puis migrent tangentielle (migration horizontale) vers le cortex et adoptent enfin une migration radiaire ou oblique pour entrer dans la pré-plaque.

La migration, radiaire ou tangentielle, des neurones corticaux est contrôlée par de nombreux gènes impliqués dans diverses fonctions cellulaires : chémoattraction/répulsion, adhésion cellulaire, mobilité cellulaire, et dynamique du cytosquelette. Par exemple, une mutation du gène *reeler*, codant pour la *reeline*, induit une inversion des couches corticales, du fait de la migration anormale des neurones corticaux. Des facteurs environnementaux, tels que les neurotransmetteurs, peuvent également affecter la migration neuronale (pour revue, Métin et al., 2008).

3. Facteurs influençant la spécification spatiale et temporelle des neurones corticaux

Pendant le développement, nous pouvons distinguer 4 étapes majeures menant d'une cellule souche pluripotente à un neurone post-mitotique : la compétence, la spécification, l'engagement, et la différenciation (Wilson et Edlund, 2001).

Afin de donner naissance aux neurones corticaux, dans un premier temps, les cellules compétentes, c'est à dire capables de devenir des précurseurs neuraux si elles reçoivent des signaux en ce sens, doivent acquérir un phénotype neural. La spécification (ou induction) neurale se fait via des signaux inhibiteurs tels que la noggine ou la chordine qui permettent la différenciation d'une partie de l'ectoderme (qui est également à l'origine de l'épiderme) vers un phénotype neural. De nombreuses études ont été réalisées pour comprendre les différents mécanismes impliqués dans l'induction neurale.

Un modèle de spécification neurale par défaut a d'abord été proposé. Selon lui, l'inhibition de la voie de signalisation des Bmp (Bone Morphogenetic Protein) par des inhibiteurs tels que la noggine ou la chordine favoriserait la spécification en cellules neurales (Bally-Cuif et Hammerschmidt, 2003). Cependant, de récentes études menées chez le poussin et la souris indiquent que bloquer la voie Bmp n'est ni suffisant ni nécessaire pour cette spécification ; au contraire, la voie Bmp pourrait même être nécessaire à l'induction neurale (Wilson et Houart, 2004). L'idée que des facteurs positifs sont aussi impliqués dans la spécification neurale est alors réapparue (Wilson et Edlund, 2001). Les protéines de la famille des Wnt, Fgf (Fibroblast growth factor), et Igf (Insulin-like Growth Factor) ont ainsi été identifiées comme favorisant la spécification neurale. Ils favoriseraient un état pré-neural que consoliderait ensuite l'inhibition de Bmp (Wilson et Houart, 2004).

L'identité du cerveau antérieur (dont le cortex) est acquise grâce à l'absence ou l'inhibition de signaux morphogènes caudalisants tels que l'acide rétinoïque, ou des molécules de la famille des Wnts, Fgfs, Bmps et Nodals (Wilson et Houart, 2004). La spécification selon l'axe dorso-ventral dépend quand à elle des signaux Shh (ventralisant) et de morphogènes de la famille des Bmp et Wnt (dorsalisants) (pour revue, Gaspard et Vanderhaeghen, 2010) (Figure 3).

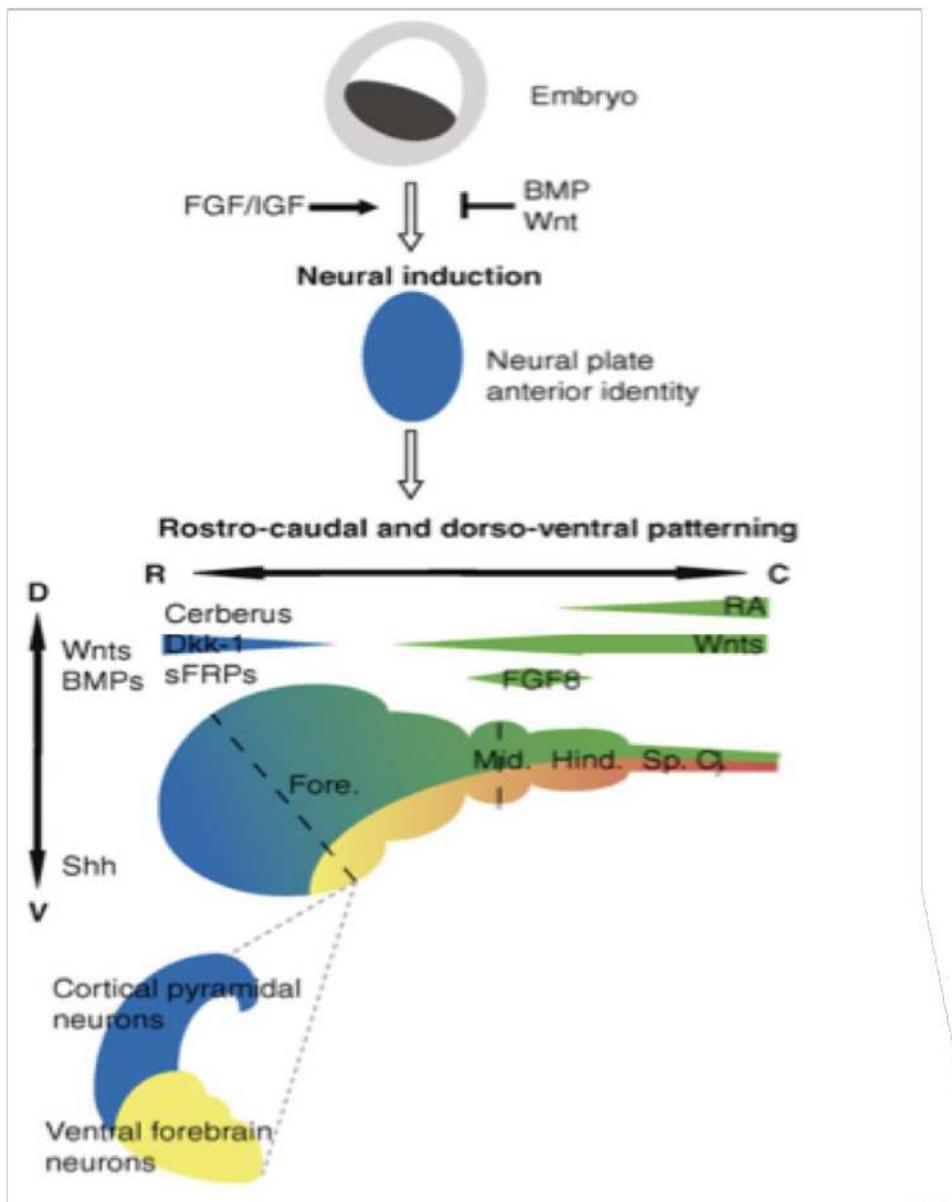


Figure 3 : Mécanismes d'induction neurale et de spécification corticale pendant la corticogénèse. L'identité neurale s'acquiert sous l'action coordonnée de morphogènes et de facteurs de croissance. L'identité corticale est acquise selon l'axe rostro-caudal en échappant à l'influence de signaux caudalisants tels que l'acide rétinoïque (RA) et les Wnt ; et selon l'axe dorso-ventral selon les gradients de concentration de Shh, Bmps et Wnts. (D'après Gaspard et Vanderhaeghen, 2010).

Après l'induction neurale, les précurseurs neuraux sont engagés de manière irréversible vers un phénotype neural et ne seront plus influencés par des facteurs pouvant réprimer le caractère neural des cellules (Wilson et Edlund, 2001).

Plus tardivement, les précurseurs sortiront du cycle cellulaire et se différencieront en neurones (neurogenèse) ou cellules gliales (gliogenèse).

4. Identité des progéniteurs neuraux

On retrouve 3 principaux types de progéniteurs neurogéniques : le neuroépithélium, la glie radiaire, et les progéniteurs intermédiaires (Figure 4).

Avant la neurogenèse, le tube neural est composé de cellules épithéliales qui forment un neuroépithélium pseudostratifié.

Au début de la neurogenèse, sous l'action de gènes tels que FoxG1 (forkhead box protein G1), Lhx2 (LIM homeobox protein 2), Pax6 (paired box protein 6) et Emx2 (empty spiracles homeobox 2), le neuroépithélium se stratifie, et la glie radiaire apparaît au niveau de la VZ. La glie radiaire exprime des marqueurs du neuroépithélium, tels que la nestine, mais aussi des marqueurs astrogliaux tels que le GLAST (astrocyte-specific glutamate transporter), S100 β , la GFAP (glial fibrillary acidic protein), la vimentine et la BLBP (brain lipid binding protein) (pour revue, Götz et Hunter, 2005).

Contrairement aux cellules neuroépithéliales, les cellules de la glie radiaire ne peuvent générer dans la plupart des cas qu'un type cellulaire : des astrocytes, des oligodendrocytes, ou le plus souvent, des neurones. Cette question fait pourtant débat, et quelques études présentent des exemples de cellules de la glie radiaire pouvant générer à la fois des neurones et des cellules gliales (pour revue Mori et al., 2005). Pendant longtemps, les cellules de la glie radiaire n'ont été considérées qu'en tant que support de la migration neuronale, et leur rôle direct dans la neurogenèse a souvent été négligé (pour revue, Mori et al., 2005). Les cellules de la glie radiaire sont capables de divisions asymétriques et génèrent soit un neurone et un précurseur de la SVZ, soit un précurseur de la VZ et un précurseur de la SVZ. Il est communément admis que les cellules de la glie radiaire sont à l'origine des neurones corticaux à projection. De récentes études montrent que certains interneurones, au moins chez l'Homme, peuvent en être issus (Yu et Zecevic, 2011). A la fin de la neurogenèse, une partie des cellules de la glie radiaire se transforment en astrocytes (pour revue, Mori et al., 2005).

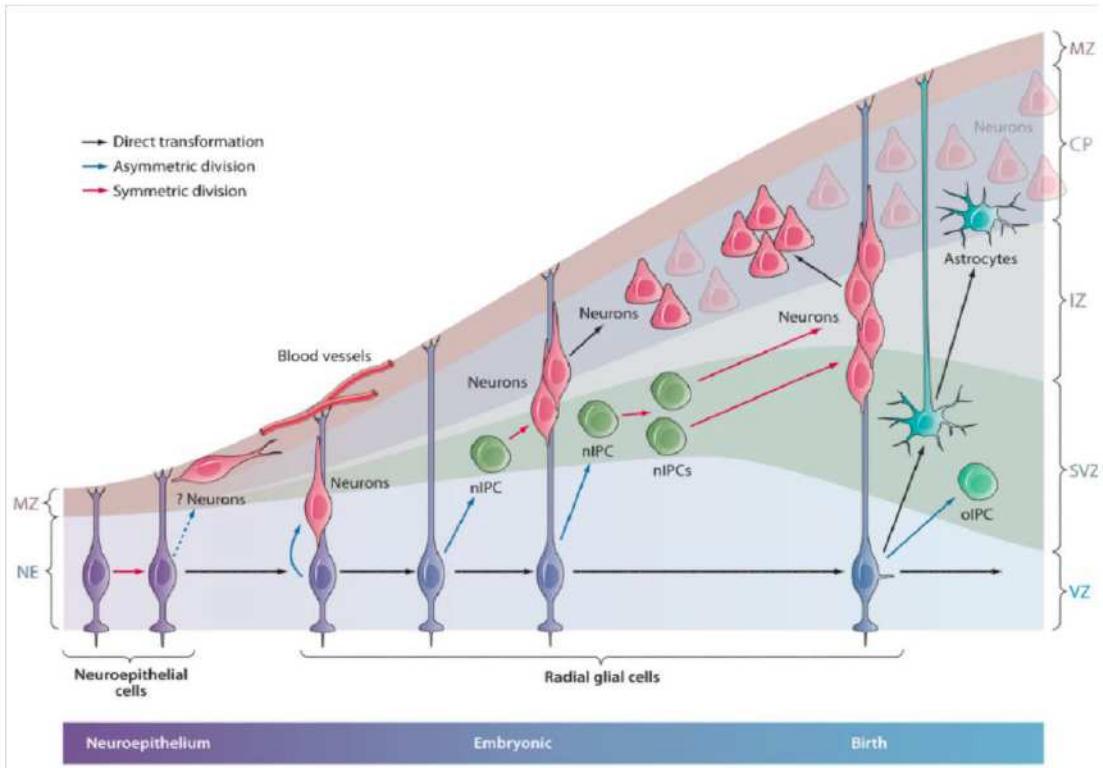


Figure 4: Identité des progéniteurs corticaux neurogéniques pendant le développement. Le stock de progéniteurs initiaux du neuroépithélium est amplifié par divisions symétriques. Ils sont ensuite transformés en cellules de la glie radiaire qui produiront par divisions asymétriques des neurones ou des progéniteurs intermédiaires neuronaux (nIPC) localisés dans la SVZ. A la fin du développement et au début de la période postnatale sont générées les cellules gliales : d'une part, des progéniteurs intermédiaires oligodendrocytaires (oIPC) sont produits par divisions asymétriques, et d'autre part, une partie des cellules de la glie radiaire se transforment en astrocytes. VZ, zone ventriculaire ; SVZ, zone sous-ventriculaire ; IZ, zone intermédiaire ; CP, plaque corticale ; MZ, zone marginale. (D'après Kriegstein et Alvarez-Buylla, 2009).

Enfin, les progéniteurs intermédiaires sont issus de cellules neuroépithéliales ou de la glie radiaire qui se sont divisées et ont migré vers la zone sous-ventriculaire (SVZ). Ces progéniteurs sont capables de produire deux neurones par division symétrique. Sous l'influence de facteurs spécifiques, ils donneront naissance dans un premier temps aux neurones des couches profondes, puis aux neurones des couches superficielles (pour revue, Götz et Hunter, 2005).

Une nouvelle population de progéniteurs neurogéniques a été décrite récemment au sein de la zone marginale. Cette population est hétérogène, et dériverait en partie du télencéphale dorsal, et du télencéphale ventral. Les progéniteurs de la zone marginale prolifèrent pendant le développement et la période post-natale ; la plupart sont des progéniteurs gliaux, et une partie sont des progéniteurs neuronaux. La majorité des progéniteurs gliaux génère des oligodendrocytes ; et certains des neurones générés par les progéniteurs neuronaux expriment des marqueurs d'interneurones. Cette population de progéniteurs représenterait 1 à 3% des progéniteurs présents pendant le développement et pourrait représenter une source supplémentaire de diversité corticale (Costa et al., 2007).

5. Diversification cellulaire

Le néocortex chez les mammifères contient un éventail de sous-types neuronaux et divers types de cellules gliales. La diversification cellulaire du cortex s'établit progressivement pendant le développement cortical sous l'influence de nombreux gènes et de mécanismes de régulation épigénétique.

a) *Neurones pyramidaux*

On retrouve différents sous-types de neurones pyramidaux dans le cortex mature. Ils ont des morphologies différentes, expriment différents facteurs de transcription, sont situés dans différentes couches, ont différents profils de projections et, *in fine*, servent différentes fonctions.

Sous contrôle génétique, les progéniteurs précoce qui ont acquis une identité corticale, se spécifient et acquièrent progressivement une identité spécifique à leur sous type neuronal (pour revue, Molyneaux et al., 2007).

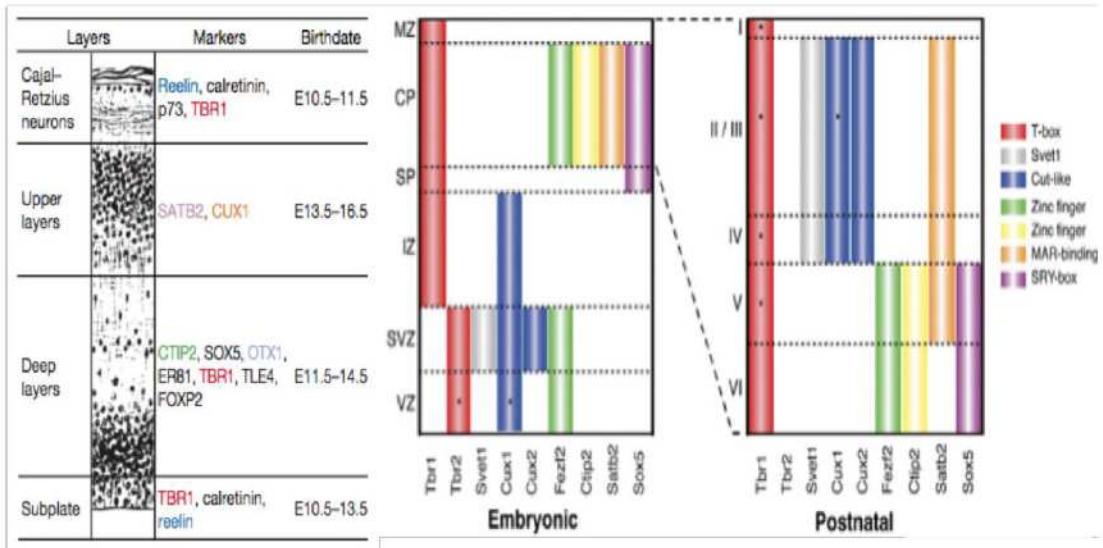


Figure 5 : Profils d'expression génique embryonnaire et postnatal murins des neurones à projection corticaux générés séquentiellement pendant la corticogénèse. MZ, zone marginale ; CP, plaque corticale ; SP, sous-plaque ; IZ, zone intermédiaire ; SVZ, zone sous-ventriculaire ; VZ, zone ventriculaire. (D'après Gaspard et al., 2008 ; Leone et al., 2008).

Nous avons vu précédemment que les différentes couches corticales ont initialement été définies selon des critères anatomiques et nous verrons que les afférences et efférences corticales varient selon les couches. Plus récemment, l'utilisation de souris transgéniques ou de techniques telles que l'hybridation *in situ* ou les puces à ADN, ont permis d'identifier de nombreux marqueurs spécifiques des neurones à projection présents dans les différentes couches corticales (Figure 5). Par exemple, après la naissance, les facteurs de transcription Svet1 (subventricular-expressed transcript 1), Cux1 (cut-like homeobox 1) et Cux2 (cut-like homeobox 2) sont des marqueurs des neurones des couches superficielles, tandis que Fezf2 (forebrain embryonic zinc finger-like protein 2), Ctip2 (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting protein 2) ou encore Sox5 (SRY-related HMG-box5) sont exprimés par les neurones des couches profondes (Leone et al., 2008).

b) Interneurones corticaux

Les interneurones corticaux proviennent de la partie ventrale du télencéphale. Les données de la littérature s'accordent sur le fait qu'ils proviennent

principalement des progéniteurs de la SVZ. Cela est en accord par exemple avec les travaux qui ont montré que chez l'embryon murin, les progéniteurs de la SVZ constituent 70% des progéniteurs du télencéphale ventral à E14, contre seulement 30% de ceux du télencéphale dorsal à E16 (10% à E12) (Smart, 1976). Plus rarement, les interneurones corticaux peuvent être issus de la glie radiaire directement, comme cela a été démontré chez l'humain mais pas chez le rongeur (Yu et Zecevic, 2011). Différents sous types sont générés, et sont caractérisés par des différences dans leur morphologie, les marqueurs qu'ils expriment, leurs projections et leurs fonctions.

L'éminence ganglionnaire est une structure transitoire présente dans le télencéphale ventral aux stades embryonnaire et postnatal. Les interneurones provenant de l'éminence ganglionnaire médiane (MGE) représentent environ 60% des interneurones corticaux, et expriment la parvalbumine ou la somatostatine, et rarement la calrétinine (pour revue, Wonders et Anderson, 2006). Les interneurones originaires de l'éminence ganglionnaire caudale (CGE) sont situés dans les couches profondes, et expriment principalement la calrétinine, même si certains expriment la parvalbumine ou la somatostatine (Xu et al., 2004). L'éminence ganglionnaire latérale (LGE) contribuerait de façon minoritaire à la production d'interneurones, dont l'identité est d'ailleurs peu documentée (pour revue, Wonders et Anderson, 2006).

c) *Cellules gliales*

Pendant le développement, la gliogenèse se déroule après la neurogenèse (pour revue, Mori et al., 2005) à partir de cellules de la glie radiaire le plus souvent distinctes de celles produisant des neurones et provenant principalement du télencéphale ventral (pour revue, Mori et al., 2005). En effet, les cellules de la glie radiaire du télencéphale ventral sont principalement non neurogéniques, sauf pendant les stades précoce du développement. Alors que la gliogenèse a lieu à la fin du développement, il est intéressant de voir que chez le rongeur, dès les stades précoce (E9), la moitié des précurseurs semblent spécifiés pour la gliogenèse (pour revue, Mori et al., 2005). En partant du principe que (à quelques exceptions près),

les cellules de la glie radiaire génèrent exclusivement un type de cellules (neurones, astrocytes ou oligodendrocytes), nous pouvons avancer les principes suivants : à la fin de la neurogenèse, le « stock » de cellules neurogéniques de la glie radiaire s'épuise en produisant deux neurones postmitotiques (Noctor et al., 2004 ; pour revue, Mori et al., 2005) ; les cellules gliogéniques de la glie radiaire seulement continuent à survivre et à proliférer. Les astrocytes, puis les oligodendrocytes sont alors générés pendant la fin du développement, et le début de la période postnatale (Bystron et al., 2006).

L'identité gliale des progéniteurs s'acquière pendant le développement sous l'influence de nombreux facteurs de croissance exprimés dans le télencéphale, citons par exemple la voie Wnt, qui lorsqu'elle est inhibée induit la gliogenèse (alors qu'elle induit la neurogenèse lorsqu'elle est activée) (Kunke et al., 2009) ; ou encore la voie Notch qui favorise la gliogenèse (Sauvageot et Stiles, 2002).

6. Particularités du cortex humain

Un certain nombre de concepts liés au développement cortical sont applicables à toutes les espèces mammifères. Cependant, pendant l'évolution, le cortex primate, et plus particulièrement humain, a connu une expansion impressionnante et qu'il serait biaisé de ne croire que quantitative. En effet, elle est associée à une augmentation de la diversité neuronale, à l'apparition de nouvelles aires corticales, la mise en place de nouvelles connexions, et finalement, à l'apparition de nouvelles fonctions (pour revue, Clownry et al., 2010).

Chez l'humain, la phase de prolifération symétrique des cellules neuroépithéliales est allongée et permettrait d'augmenter leur nombre avant qu'apparaissent les cellules de la glie radiaire. La phase de neurogenèse est également plus longue chez l'humain et permet d'y générer un nombre supérieur de neurones.

Par ailleurs, la SVZ est plus large chez l'humain et apparaît plus tôt pendant le développement. Les progéniteurs intermédiaires n'y seraient pas nécessairement beaucoup plus diversifiés, mais leur potentiel de différenciation ne

serait pas progressivement restreint comme c'est le cas chez les rongeurs, d'où un accroissement de la diversification cellulaire (pour revue, Bystron et al., 2008).

C. Le cortex moteur et ses connexions

1. Organisation du cortex moteur

Nous avons utilisé dans notre travail un modèle de lésion par aspiration du cortex moteur suivie ou non de transplantation de neurones corticaux chez la souris ; nous nous focaliserons donc par la suite sur cette région corticale.

Le cortex moteur participe de manière directe ou indirecte à la planification, au contrôle, et à l'exécution des commandes motrices volontaires par les différents systèmes de projections que nous allons décrire dans le paragraphe suivant.

Il est situé dans le lobe frontal du cortex cérébral et comprend les cortex moteurs primaire (ou M1) et secondaire (ou M2, formé par le cortex pré moteur et l'aire motrice supplémentaire).

Le cortex moteur respecte une organisation somatotopique anatomique et fonctionnelle précise. Ainsi, des expériences de microstimulation intracorticale réalisées à partir des années 80, ont permis de définir une cartographie fonctionnelle du cortex moteur chez le rat. Elle définit, pour chaque site du cortex moteur stimulé, le mouvement induit, et le seuil d'intensité de stimulation à partir duquel une réponse est obtenue. Des études de Neafsey (Neafsey et Sievert, 1982 ; Neafsey et al., 1986) présentent une cartographie détaillée du cortex moteur du rat obtenue par stimulation électrique, et définissent une nomenclature fréquemment reprise dans ce type d'études. Cinq zones ont en effet été décrites : RFL, CFL, HL, V-FEF, JLT. Deux zones permettent le contrôle des pattes antérieures : la RFL (rostral forelimb area) qui occupe une position rostrale et contrôle les parties distales et la CFL (caudal forelimb area), plus caudale, qui contrôle les mouvements proximaux et est activée pour des seuils de stimulation légèrement supérieurs. La zone HL correspond aux pattes postérieures ; V-FEF aux vibrisses et aux paupières ; et JLT à la

mâchoire, aux lèvres et à la langue (Figure 6). La stimulation des zones HL, RFL et CFL entraîne le plus souvent un mouvement controlatéral (Pronichev et Lenkov, 1998).

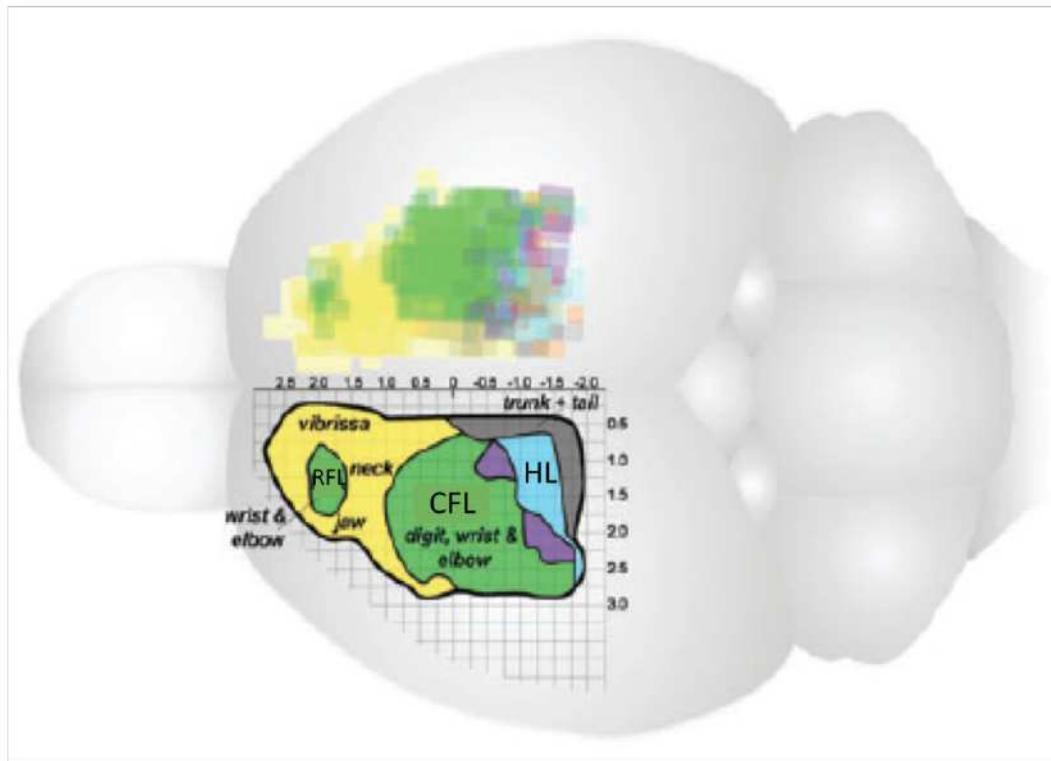


Figure 6: Représentation schématique de l'organisation du cortex moteur primaire chez la souris définie à partir d'expériences de microstimulation intracorticale. Dans l'hémisphère gauche, les zones vertes représentent les régions contrôlant les mouvements des pattes antérieures ; les jaunes, les mouvements de la tête, et les bleues, les mouvements des pattes postérieures. Les zones transparentes dans l'hémisphère droit représentent les superpositions entre les différentes zones. Les distances sont indiquées en millimètres à partir du point d'origine Bregma. CFL, caudal forelimb area ; RFL, rostral forelimb area ; HL, hindlimb area. (D'après Tennant *et al.*, 2011).

Anatomiquement, cela s'explique par la décussation présente au sein du faisceau pyramidal à la jonction entre le bulbe et la moelle épinière. En revanche, la représentation des muscles faciaux est plus souvent ipsilatérale, les fibres corticales ne passant pas par les voies descendantes pour atteindre ces régions.

2. Connexions corticales

L'utilisation de techniques de traçage des voies nerveuses, permettant de marquer les neurones et leurs prolongements axonaux, a permis de mettre en évidence les connexions entre les différentes régions du cerveau. Par exemple, l'utilisation de marqueurs rétrogrades (qui migrent de la terminaison axonale vers le soma) ou antérogrades (qui migrent du corps cellulaire vers la terminaison axonale) tels que la CTB (sous-unité B de la toxine cholérique) ou la PHA-L (Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin) fournit des données anatomiques relatives à l'organisation des systèmes de projections du système nerveux central.

a) Efférences corticales

Les neurones pyramidaux du cortex moteur émettent des projections qui suivent une organisation topographique précise vers des cibles corticales ou sous corticales. Nous allons ici décrire les principaux systèmes de projections du cortex moteur (certaines ne lui sont pas exclusives et sont présentes dans d'autres aires corticales) (Figure 7).

Les projections cortico-spinales (ou faisceau pyramidal) forment le faisceau moteur direct entre le cortex et la moelle épinière. Elles sont émises par les neurones pyramidaux de la couche V et représentent les principales efférences du cortex moteur. Elles descendent jusqu'à la décussation pyramidale, où 75 à 90% d'entre elles croisent la ligne médiane (ainsi, le contrôle moteur de chaque côté du corps se fait principalement par le cortex contralatéral), puis elles contactent des interneurones ou des motoneurones spinaux (pour revue, Al Masri 2011).

Les projections cortico-rubrales forment le principal faisceau moteur indirect (présence d'un relai) entre le cortex moteur et la moelle épinière. Les neurones pyramidaux de la couche V émettent des projections majoritairement ipsilatérales vers le noyau rouge. Ces projections suivent une organisation topographique précise. Par exemple, la partie dorsomédiale du noyau rouge reçoit des afférences provenant du cortex sensorimoteur contrôlant les pattes antérieures alors que la partie

ventrolatérale reçoit des afférences du cortex sensorimoteur contrôlant les pattes postérieures (Song et Murakami, 1998). Ces parties du noyau rouge projettent ensuite respectivement vers les régions cervicales et lombaires de la moelle (Song et Murakami, 1998).

D'autres systèmes de projections indirects vers la moelle épinière existent ; la voie cortico-vestibulo-spinale, la voie cortico-reticulo-spinale et la voie cortico-tectospinale. Ils sont principalement impliqués dans le contrôle de la posture et l'équilibre.

Les projections cortico-striatales constituent les principales afférences du striatum et participent au contrôle et à l'exécution du mouvement. Ces projections sont bilatérales, avec une prédominance ipsilatérale (Mc Georges et Faull, 1989), et ont été décrites chez tous les mammifères étudiés (Oka, 1980 ; Selemon et Goldmann-Rakic, 1985 ; Tanaka et al., 1981 ; Veenin et al., 1980). Elles sont principalement issues des neurones pyramidaux de la couche V (surtout la couche Va), mais aussi des couches III et VI (Mc Georges et Faull, 1989 ; Akintunde et Buxton, 1992). Par ailleurs, certaines fibres ipsilatérales sont en fait des collatérales de fibres corticofugales (vers des cibles sous corticales) (Reiner et al., 2010). Les projections du cortex sensorimoteur vers le striatum dorsolatéral suivent une organisation topographique : ainsi, par exemple, la partie rostrale du cortex sensorimoteur projette vers les régions ventrale et centrale du striatum dorsolatéral, tandis que la partie caudale du cortex sensorimoteur projette vers la région dorsale du striatum dorsolatéral (Mc Georges et Faull, 1989 ; Ebrahimi et al., 1992). Cependant, une région donnée du striatum peut recevoir des afférences convergeant de multiples aires corticales (Reiner et al., 2010). Par exemple, Hoffer et Alloway, en injectant différents traceurs antérogrades dans les régions motrices et somatosensorielles correspondant aux vibrisses chez le rat, ont démontré que le striatum reçoit des projections convergentes de régions analogues du cortex moteur primaire et du cortex somatosensoriel (Hoffer and Alloway, 2001). Les projections convergentes peuvent aussi provenir de régions non liées. Ainsi, les régions corticales correspondant aux pattes chez le rat, envoient quelques projections dans

la partie du striatum qui reçoit normalement les afférences de la zone correspondant aux vibrisses et vice-versa (Brown et al., 1998).

A propos des connexions entre le cortex et le thalamus, nous parlerons dans cette section de circuit « thalamo-corticothalamique ». En effet, si le thalamus s'est longtemps vu attribuer le simple rôle de relais des informations sensorielles au cortex (par les fibres thalamocorticales), nous savons maintenant que le rétrocontrôle par les fibres corticothalamiques influence le traitement des informations sensorielles provenant de l'extérieur (pour revue, Briggs et Ursey, 2008).

Avec l'introduction du concept de réciprocité par Diamond (1969), qui énonce que chaque aire corticale envoie des projections vers le noyau thalamique dont il reçoit des afférences (Diamond et al., 1969), on a longtemps pensé que les systèmes de projections cortico-thalamiques et thalamo-corticales étaient réciproques. Nous savons maintenant qu'un certain nombre des connexions entre le cortex et le thalamus ne sont pas réciproques, et le concept de parité est alors préféré. Il définit que la distribution des projections corticothalamiques est déterminée par l'organisation des afférences préthalamiques (Deschênes et al., 1998).

Les neurones de la couche VI émettent des projections à la fois vers le thalamus, et vers les neurones de la couche IV du cortex qui reçoivent les afférences thalamiques (pour revue, Briggs et Ursey, 2008). Ils exercent par ailleurs un contrôle inhibiteur sur le thalamus de deux manières : en ciblant des interneurones thalamiques, ou en ayant pour relai les neurones GABAergiques du noyau réticulaire du thalamus. Le thalamus reçoit également des collatérales des neurones à projection de la couche V qui innervent d'autres cibles sous corticales du cortex. Notons également qu'un certain nombre de régions corticales émettent des projections bilatérales vers le thalamus.

Nous ne détaillerons pas ici toutes les afférences et efférences liées aux différents noyaux thalamiques, notons simplement que les connexions entre le cortex et le thalamus répondent à une organisation somatotopique précise.

Les projections cortico-pontiques, émises par les neurones pyramidaux de la couche V, forment un faisceau indirect entre le cortex et le cervelet (relais par les noyaux du pont qui émettent des projections vers le cortex cérébelleux). Elles participent ainsi au contrôle de la motricité, et notamment au maintien de la posture et à la coordination spatiale et temporelle des mouvements. La plupart présentent une organisation somatotopique puisque les différentes régions du cortex cérébral projettent dans des régions précises des noyaux du pont, mais certaines sont convergentes (Wiesendanger et Wiesendanger, 1982).

Les projections cortico-corticales développées par les neurones pyramidaux forment un dense réseau qui permet de connecter les différentes aires corticales, souvent de manière réciproque. Elles s'établissent à la fois au sein d'un même hémisphère, ou en direction de l'hémisphère opposé (qu'elles atteignent en passant par le corps calleux). Les neurones des couches II, III, V et VI émettent des projections controlatérales ; ceux de la couche V, des projections ipsilatérales (pour revue, Molyneaux et al., 2007).

b) Afférences corticales

Le cortex reçoit de nombreuses afférences notamment du cortex et du thalamus, comme décrit dans la section précédente. Il reçoit également des afférences de l'hypothalamus, de la substance noire et l'aire tegmentale ventrale (pour revue, Björklund et Dunnett, 2007), du noyau de Meynert, des noyaux du raphé, du locus coeruleus et de la zona incerta (Lin et al., 1990).

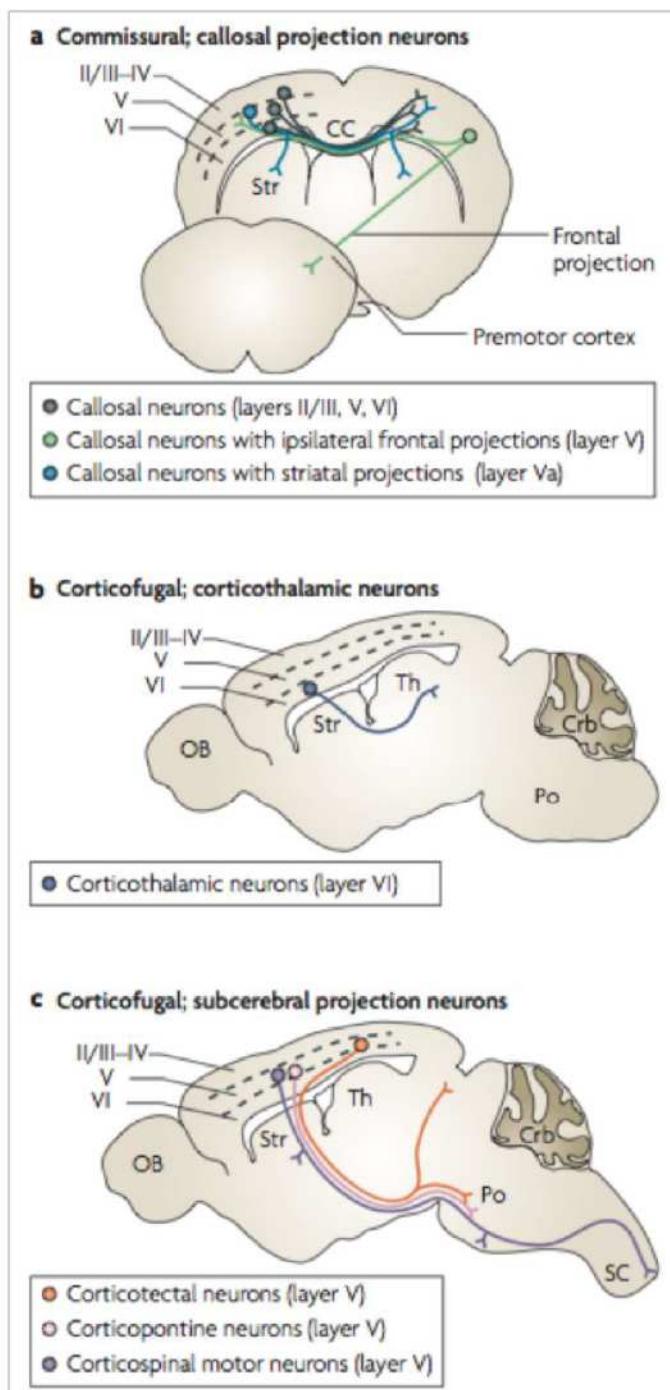


Figure 7 : Représentation des principaux systèmes de projections du cortex moteur. (a) Les neurones pyramidaux de taille moyenne des couches II/III, V, VI émettent des projections qui empruntent le corps calleux vers le cortex controlatéral (en noir), vers le cortex controlatéral ou le striatum ipsilatéral ou controlatéral (en bleu), et vers le cortex controlatéral ou le cortex ipsilatéral frontal (en vert). (b) Les neurones pyramidaux de la couche VI, et minoritairement de la couche V, envoient des projections vers les noyaux thalamiques. (c) Les grands neurones pyramidaux de la couche V émettent des projections vers le tectum dont les collatérales ciblent le pont (en orange), vers les noyaux du pont (en rose), et vers la moelle épinière dont les collatérales ciblent le striatum, le noyau rouge, le pont et la médulla (en violet). CC, corps calleux ; Str, striatum ; Th, thalamus ; Po, pont ; OB, bulbe olfactif ; Crb, cervelet ; SC, moelle épinière. (D'après Molyneaux et al., 2007).

D. Lésion du cortex moteur

Chez l'humain, diverses conditions pathologiques peuvent causer des lésions du cortex moteur (accident vasculaire cérébral, traumatisme, maladie neurodégénérative, tumeur, produits neurotoxiques,...) et entraîner des déficits moteurs importants. Bien qu'un certain nombre d'études réalisées chez l'humain, le primate non-humain ou le rongeur permettent de démontrer un certain niveau de récupération fonctionnelle spontanée après une lésion du cortex moteur (pour revue, Darling et al., 2011), il est nécessaire de développer des stratégies thérapeutiques pour pallier aux déficits induits.

1. Modèles animaux de lésion corticale

Le recours aux modèles animaux, définis par l'American National Research Council Committee on Animal Models for Research and Aging comme « des modèles permettant l'étude de données de référence sur la biologie ou le comportement, ou chez lequel on peut étudier un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales », permet d'étudier les lésions du système nerveux central et de tester des stratégies réparatrices. Il faut cependant toujours rester prudent quant à l'extrapolation à d'autres espèces des résultats obtenus ; des essais cliniques seront toujours nécessaires. Du rongeur au primate non-humain, de nombreux modèles animaux de lésion corticale sont documentés, parmi eux :

- les modèles d'ischémie partielle ou complète, où une lésion cérébrale est induite par diminution de l'apport sanguin à une région, plusieurs régions, ou à l'ensemble du cerveau. Les chocs ischémiques chez l'humain étant le plus souvent dus à une occlusion d'une artère cérébrale majeure, le modèle d'ischémie le plus utilisé est l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO : middle cerebral artery occlusion) (pour revue, Liu et Mc Cullough, 2011).

- les modèles de lésion cérébrale traumatique (TBI : traumatic brain injury). Il s'agit d'obtenir une lésion par une « force physique externe » ; par exemple un impact localisé.
- les modèles neurotoxiques sont obtenus par administration d'un composé neurotoxique tel que l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) ou l'acide iboténique. Leur administration entraîne une stimulation massive des récepteurs glutamatergiques, induisant ainsi d'importants flux calciques et sodiques, et menant à la dégénérescence neuronale.
- le modèle de lésion corticale par aspiration, tel que nous l'avons utilisé dans le cadre de ce travail, est une ablation par aspiration de toute l'épaisseur du cortex. Notre lésion cible la zone du cortex moteur qui contrôle le mouvement des membres antérieurs, et n'atteint pas le corps calleux. La lésion par aspiration entraîne une destruction immédiate des corps cellulaires et axones afférents et efférents.

2. Lésion du cortex moteur : considérations fonctionnelles

La lésion du cortex moteur entraîne des déficits dans l'exécution des fonctions motrices. Une batterie de tests est disponible afin d'évaluer chez le rongeur les fonctions motrices, leurs dysfonctionnements en conditions pathologiques, et leur récupération dans le cadre de l'évaluation de stratégies neuroprotectrices ou réparatrices. Le choix des tests utilisés est crucial, et en fonction du test utilisé, différentes composantes peuvent être analysées, de la motricité globale de l'animal à la motricité fine d'un membre par exemple (pour revue, Brooks et Dunnett, 2009). Nous allons ici détailler les différents tests que nous avons utilisés dans notre étude afin d'évaluer l'effet sur les capacités motrices chez la souris d'une lésion du cortex moteur, suivie ou non d'une transplantation de tissu embryonnaire.

a) Test de suspension

Ce test de locomotion qui permet d'évaluer le comportement moteur des animaux suppose un niveau important de réalisation et de coordination des gestes, ainsi qu'une force musculaire suffisante, puisque l'animal doit évoluer suspendu à une surface grillagée retournée. Le nombre de chutes et d'erreurs de placement de pattes est comptabilisé et indique l'importance du déficit observé.

L'utilisation de ce test a permis de mettre en évidence des déficits moteurs induits par une lésion par aspiration du cortex moteur du rat nouveau-né, et les effets bénéfiques de la transplantation de tissu embryonnaire dans ce même modèle (Plumet et al., 1990).

b) Analyse de la démarche (Gait analysis)

Ce test permet l'analyse des appuis des pattes réalisés par l'animal et leur coordination lors de déplacements volontaires et spontanés. Il apporte ainsi des informations sur la démarche globale, mais aussi sur le placement de chaque patte de manière individuelle. Ainsi, il est possible de mettre en évidence des déficits unilatéraux. L'enregistrement vidéo des tracés des appuis des pattes de l'animal le long d'un couloir de plexiglas présente l'avantage de fournir simultanément des informations à la fois spatiales et temporelles telles que la vitesse de déplacement, la durée des appuis, les distances entre les appuis des différentes pattes et l'intensité des appuis.

Ce test s'est révélé efficace pour établir la présence de déficits moteurs durables dans différents modèles de lésions : lésions ischémiques (Wang et al., 2008 ; Vandeputte et al., 2010 ; Encarnacion et al., 2011), contusion de la moelle épinière (Koopmans et al., 2005), modèle animal de la maladie de Parkinson par injection de 6-hydroxydopamine dans le striatum ou la voie mésostriatale chez le rat (Chuang et al., 2010 ; Vandeputte et al., 2010), modèle animal de la maladie de Huntington par expression d'un fragment tronqué du gène de la huntingtine (Vandeputte et al., 2010) ; et les effets bénéfiques de stratégies neuroprotectrices (Koopmans et al., 2005 ; Wang et al., 2008) ou réparatrices (Chuang et al., 2010).

c) *Test de l'escalier (Staircase test) de Montoya*

Le test de l'escalier de Montoya a été développé il y a une vingtaine d'années tout d'abord chez le rat (Montoya et al., 1991), puis a par la suite été adapté à la souris (Baird et al., 2001). Il permet d'évaluer l'usage des pattes antérieures dans des tâches de préhension de nourriture. Ceci permet d'évaluer, dans une démarche volontaire de l'animal, des variations de la motricité fine : l'animal doit atteindre, attraper, et porter correctement à sa gueule les boulettes de nourriture placées sur les différentes marches de l'escalier. De plus, l'animal ne pouvant accéder à la nourriture placée de chaque côté de l'escalier que par la patte placée de ce même côté, ce test permet de mesurer les aptitudes de chaque patte antérieure de manière indépendante et spécifique.

L'usage de ce test a permis de mettre en évidence des déficits moteurs consécutifs à une lésion unilatérale dans de nombreuses structures cérébrales dont le cortex (Montoya et al., 1991 ; Baird et al., 2001), le striatum (Frick et al., 1996), et des lésions ischémiques (Grabowski et al., 1993b ; Soleman et al., 2010). Il a par ailleurs permis de démontrer les effets bénéfiques de greffes de neurones dans des modèles de maladie de Parkinson ou de Huntington (Nakao et al., 1996 ; Fricker et al., 1997 ; Cordeiro et al., 2010).

Différentes stratégies thérapeutiques sont envisagées pour réparer le cerveau lésé ; parmi elles, les thérapies cellulaires qui font l'objet de notre travail, occupent une place importante. Il s'agit de remplacer les neurones dégénérés soit par un apport extérieur de cellules grâce à la transplantation neuronale (nous le détaillerons dans le prochain chapitre de cette introduction), soit en mobilisant les cellules souches endogènes présentes dans certaines régions du cerveau (nous le présenterons dans le dernier chapitre de cette introduction).

II. Réparation cérébrale par transplantation neuronale

La transplantation neuronale est envisagée comme approche thérapeutique, mais est également un formidable outil expérimental pour comprendre les mécanismes fondamentaux liés au développement ou à la réparation cérébrale. Après des rappels historiques, nous présenterons dans ce chapitre les principaux résultats obtenus dans le domaine.

A. Rappels historiques

1. Les débuts (1890-1940)

L'idée de greffer des neurones pour réparer les lésions du cerveau a émergé il y déjà plusieurs siècles. Ainsi, en 1564, Ambroise Paré, chirurgien du roi de France, écrit au sujet d'un homme, qui pensait son cerveau malade, qu'il lui aurait demandé « d'ouvrir sa tête, d'enlever son cerveau malade et de le remplacer par un autre » (pour revue, Dunnett, 2010).

Cependant, ce n'est qu'en 1890, avec l'étude « Successful Brain Grafting» publiée par W. Gilman Thompson dans New York Medecine Journal, que l'on retrouve l'expérience considérée comme la première à avoir été réalisée dans ce domaine (pour revue, Dunnett, 2010). Dans cette étude, Thompson a réalisé des transplantations homotypiques de fragments de tissu cortical, issus du lobe occipital de chiens adultes, chez le chien (allogreffes) ou le chat (xénogreffes) adultes. Il

rapporta la présence de tissu greffé trois jours après la transplantation sur 3 cas ; et étudia la survie de la greffe après 7 semaines sur le 4^e cas (Thompson, 1890). Mais les techniques de l'époque ne permettent pas d'affirmer si le tissu observé à ce terme provenait bien du donneur, ni s'il contenait des neurones, ou s'il correspondait plutôt à une réaction inflammatoire de l'hôte (pour revue, Dunnett 2010).

Malgré ces doutes sur la viabilité des transplants, Thompson ouvrit ainsi la voie à des décennies de recherche expérimentale dans le domaine de la transplantation neuronale.

En 1907, G. Del Conte, réalisa la première tentative de greffe intracérébrale de tissu embryonnaire chez le chien (Del Conte, 1907).

Peu après, en 1917, E. Dunn reporta le premier cas de survie de tissu néonatal transplanté dans le cerveau de rat adulte (Dunn, 1917). Elle conclut en énonçant des concepts fondamentaux qui marquent le début de l'ère pré-moderne : « les tissus nerveux immatures survivent mieux à la transplantation » et « le transplant doit recevoir une vascularisation adéquate ».

2. L'ère pré-moderne (1940-1970)

L'ère pré-moderne, et les progrès techniques l'accompagnant, ont permis de mettre en évidence la capacité des cellules transplantées à survivre et à se différencier en neurones matures. Citons ici les travaux de Le Gros Clark qui réussit la première greffe de tissu nerveux embryonnaire dans le néocortex de jeunes lapins (âgés de 6 semaines). De manière intéressante, il met en évidence la survie des tissus greffés, ainsi que leur capacité à poursuivre leur développement et leur différenciation (Le Gros Clark, 1940).

Les possibilités de régénération axonale sont également étudiées après transplantation de fragments de nerf sciatique dans le cortex (Le Gros Clark, 1942) ou dans des modèles de lésion de la moelle épinière (Sugar et Gerard, 1940).

3. L'ère moderne (depuis 1970)

L'ère moderne s'ouvre notamment avec les travaux de l'équipe de Joseph Altmann qui introduit de nouvelles techniques anatomiques et de marquages telles que l'injection de [³H] thymidine afin de marquer les cellules en prolifération dans le transplant (Das et Altmann, 1971). Nous ne détaillerons pas davantage cette section, étant donné la quantité de travaux majeurs dans le domaine ces quarante dernières années ; nous reviendrons plus en détail sur certains par la suite.

Fait majeur de cette période : l'apparition des essais cliniques. En 1982 et 1983, pour la première fois, deux patients parkinsoniens reçoivent une autogreffe de cellules surrénauliennes (Backlund et al., 1985), mais sans résultats probants. Les premiers succès arrivent quelques années plus tard, grâce à l'implantation de tissu nigral embryonnaire dans le noyau caudé putamen (CPu) qui apporta des améliorations cliniques significatives (Lindvall et al., 1990).

Dans la suite de ce chapitre, nous allons revenir sur les principaux résultats obtenus dans le domaine de la transplantation neuronale à partir de différentes sources de neurones greffés, en ciblant principalement les résultats obtenus dans le cortex.

B. Transplantation de neurones embryonnaires corticaux

1. Chez le nouveau-né

A partir des années 1980, la capacité de survie des tissus embryonnaires transplantés a été établie, et de nombreuses études se sont intéressées au potentiel de réparation qu'ils offraient à la fois sur les plans neuroanatomique et fonctionnel.

Dans un premier temps, les études menées chez le rat nouveau-né ont mis en évidence l'établissement de connexions entre l'hôte et le transplant (Chang et al.,

1984 ; Floeter et Jones, 1984 ; Jaeger et Lund, 1980 ; Stanfield et O'Leary, 1985). La plupart des études utilisent les techniques d'injection intracérébrale de traceurs antérogrades ou rétrogrades dans le transplant ou l'hôte pour mettre en évidence ces connexions (intra-greffe, du transplant vers l'hôte, et de l'hôte vers le transplant). En ce qui concerne les projections émises par le transplant, par exemple, en 1985, Castro réalise des transplantations de fragments de tissu embryonnaire cortical prélevés entre E15 et E17 (au 15^e ou 17^e jour de vie embryonnaire) chez le rat nouveau-né (à P0-P1, soit le jour ou le lendemain de la naissance) dont le cortex moteur a été préalablement lésé par aspiration dans environ la moitié des cas. Puis il réalise des injections de traceurs fluorescents rétrogrades dans une région homotopique du cortex controlatéral au transplant, et dans les noyaux postérieurs et ventrobasal du thalamus ipsilatéral par rapport au site de transplantation. Il met ainsi en évidence des projections cortico-corticales callosales émises par le transplant. Notons que ce type de projections est présent dans tous les cas étudiés, lorsque la transplantation est précédée d'une lésion (contrairement aux cas non lésés où seulement 3 cas sur 8 présentent ce type de projections), et de plus, le nombre de fibres est plus important dans les cas lésés. De même, lorsque l'hôte est lésé avant de recevoir un transplant, les transplants se développent mieux. Ainsi, il apparaît que certaines conditions peuvent influer sur le développement des cellules transplantées. Nous consacrerons une partie de ce chapitre à ce sujet. Les injections de traceurs rétrogrades réalisées dans le thalamus, permettent de mettre en évidence la présence de neurones au sein du transplant envoyant des projections vers le thalamus. Celles-ci ne semblent pas être influencées par la présence ou non d'une lésion avant la transplantation. Ces projections semblent respecter la topographie corticale, et proviennent de neurones différents organisés en bandes ou « clusters » (même si l'organisation laminaire dans le transplant ne semble pas évidente). D'autres travaux démontrent la présence de projections entre les neurones transplantés et le thalamus, le striatum (Chang et al., 1984), ou la moelle épinière de l'hôte (Floeter et Jones, 1984 ; Jaeger et Lund, 1980). En 1992, Sørensen confirme le développement de projections respectant la topographie corticale vers ces différentes cibles mais leur densité semble moindre (Sørensen et al., 1992).

Ensemble, ces résultats suggèrent que les neurones embryonnaires corticaux peuvent remplacer les voies lésées chez le nouveau-né.

De la même manière, un certain nombre d'études a mis en évidence les projections, notamment thalamiques et corticales, émises par l'hôte vers le transplant (Chang et al., 1986 ; Frappé et al., 1999).

Ainsi, les neurones transplantés sont connectés avec l'hôte par le biais d'afférences et d'efférences dont l'organisation correspond à celle retrouvée dans le cortex intact. Qu'en est-il lorsque l'origine des fragments embryonnaires prélevés ne correspond pas au site de transplantation, c'est à dire dans le cas de greffes hétérotopiques ?

En 1986, Chang (Chang et al., 1986) réalise une étude pour laquelle il transplante des fragments de neurones corticaux embryonnaires d'origine frontale ou occipitale (prélevés à E15) dans le cortex occipitopariétal de rats nouveau-nés. Il observe que quelle que soit leur origine, les transplants reçoivent des projections provenant des noyaux thalamiques qui innervent normalement la région corticale où a été effectuée la transplantation. Par ailleurs, il a démontré la présence d'une organisation laminaire des cellules présentes au sein du transplant. Il conclut donc que l'organisation laminaire du transplant semble être une propriété intrinsèque des cellules transplantées ; par contre, les afférences que reçoit le transplant dépendent de l'environnement dans lequel les cellules transplantées se développent. Ses résultats ont par la suite été contredits. En effet, de nombreux travaux ont porté, au-delà des capacités de reconstruction des voies lésées des transplants, sur l'importance de facteurs intrinsèques ou extrinsèques dans les phénomènes de régionalisation corticale. L'étude des efférences (Gaillard et al., 1994 ; Gaillard et al., 1998) et afférences (Frappé et al., 1999) de neurones corticaux transplantés de façon homotopique ou hétérotopique dans le cortex du rat nouveau-né, a permis de démontrer que les transplants hétérotropiques, non seulement envoient des projections en direction de cibles corticales et sous corticales correspondant à leur région d'origine, mais sont aussi capables de «réorienter» les afférences thalamiques relatives à leur région d'origine. Ainsi, l'origine des neurones corticaux greffés

apparaît comme un élément déterminant pour la mise en place des circuits neuronaux néoformés ; et les neurones embryonnaires conservent des propriétés de développement en accord avec leur site d'origine. De la même manière, en terme de fonctionnalité, les transplants homotopiques peuvent être bénéfiques, contrairement aux transplants hétérotropiques dont l'effet peut à l'inverse être délétère (Barth and Stanfield, 1994). Ces résultats corroborent l'hypothèse du protomap (que nous avons définie en première partie de cette introduction) développée par Rakic en 1988. Ceci est vrai dans les cas où le tissu embryonnaire est prélevé aux stades tardifs du développement cortical (après E13/E14). En effet, à ce stade du développement, les précurseurs neuronaux sont engagés irréversiblement dans une voie de différenciation. A l'inverse, si le tissu embryonnaire est prélevé avant le début de la corticogenèse, au stade où le tissu contient seulement des précurseurs multipotents, il a la capacité, s'il est transplanté de manière hétérotopique, d'être influencé par son nouvel environnement, et d'acquérir un phénotype correspondant à celui-ci (Gaillard et al., 2003 ; Pinaudeau et al., 2000).

Les possibilités de régénération étant établies d'un point de vue anatomique chez le nouveau-né, qu'en est-il de la fonctionnalité de ces transplants ?

Différentes techniques permettent d'étudier cette question :

- l'analyse de l'activité métabolique du transplant par mesure de la consommation de 2-deoxylglucose (2-DG)
- les tests comportementaux permettent d'évaluer la capacité des transplants à induire la récupération des fonctions motrices perdues suite à la lésion
- l'électrophysiologie permet de tester l'intégration fonctionnelle des transplants *in vivo* (activité unitaire spontanée ou en réponse à une stimulation) ou *in vitro* (le patch clamp consiste en l'enregistrement des courants ioniques transitant à travers la membrane cellulaire, et permet d'étudier l'excitabilité des neurones greffés).

Des tests comportementaux ont permis de démontrer les effets bénéfiques sur le plan fonctionnel des greffes de cortex embryonnaire d'origine moteur transplantés dans le cortex moteur du rat nouveau-né lésé. En 1990, Plumet (Plumet

et al., 1990) évalue sur ce modèle la motricité fine des pattes antérieures par un test comportemental de suspension. Son étude comporte 3 groupes d'animaux : contrôle, lésé, ou lésé et transplanté immédiatement après la lésion, et s'étend sur 108 jours après la chirurgie. Les performances motrices des animaux lésés sont systématiquement moins bonnes que celles des groupes contrôle et greffé. Ainsi, la greffe semble favoriser durablement la récupération des capacités motrices dues à la lésion, et cette récupération ne peut être attribuée aux phénomènes de plasticité présents chez le nouveau-né. De plus, dans une autre étude, il a été démontré que l'ablation du greffon induit des déficits moteurs semblables à ceux observés après lésion corticale (Sandor et al., 1991).

L'intégration fonctionnelle des transplants est également démontrée par leur capacité à répondre à une stimulation. En effet, l'enregistrement en électrophysiologie de l'activité unitaire des transplants a permis de montrer que les neurones greffés peuvent répondre à une stimulation sensorielle périphérique (des pattes antérieures), ou à une stimulation électrique de régions projetant vers la greffe comme le thalamus (Naefsey et al., 1989).

2. Chez l'adulte

Pendant longtemps, le système nerveux central adulte a été considéré comme un système immuable, où les phénomènes de plasticité, de neurogenèse, et de régénération axonale ne prenaient pas place. Ce dogme est résumé ainsi par Santiago Ramon y Cajal : « *Once development was ended, the fonts of growth and regeneration of the axons and dendrites dried up irrevocably. In the adult centers, the nerve path are something fixed, and immutable: everything may die, nothing may be regenerated* » (Ramon y Cajal, 1928).

La régénération du système nerveux central adulte après lésion est limitée du fait de la présence de facteurs inhibiteurs associés à la myéline tels que Nogo-A (pour revue, Wang et al., 2012), MAG (myelin-associated glycoprotein) et OMgp (oligodendrocyte-myelin glycoprotein) qui rendent l'environnement peu permissif à la repousse axonale. De même, la réaction astrocytaire engendrée par la lésion crée

une barrière physique et biochimique limitant la régénération post-traumatique (Gaillard et Jaber, 2007).

L'étude dans les années 1990 de la fonctionnalité de neurones corticaux embryonnaires transplantés dans le cortex lésé adulte a permis de mettre en évidence un niveau de récupération fonctionnelle significatif. Après lésion unilatérale du cortex moteur chez le rat, Plumet et al., observent des déficits moteurs bilatéraux, mais avec une prédominance controlatérale, dans des tests de préhension de nourriture qui permettent de mettre en évidence des déficits de la motricité fine des pattes antérieures (la lésion étant faite dans la partie du cortex moteur qui contrôle ces membres). Alors que les scores de la patte controlatérale à la lésion du groupe lésé se stabilisent après 4 semaines, ceux du groupe transplanté continuent à s'améliorer, sans cependant atteindre les niveaux pré-opératoires. Ainsi, cette étude met en évidence une récupération fonctionnelle partielle des mouvements fins des pattes antérieures après transplantation (Plumet et al., 1993). Le choix du test comportemental utilisé est crucial et doit permettre de mettre en évidence des déficits moteurs très fins. Ainsi, Riolobos arrive aux mêmes conclusions que Plumet lorsqu'il utilise le même test ; en revanche, l'analyse de capacités motrices plus globales par la mesure de la force musculaire et de l'activité locomotrice (test de l'open field) ne lui permettent pas de mettre en évidence une quelconque différence entre les groupes contrôle, lésé, et transplanté (Riolobos et al., 2001).

Par ailleurs, l'étude de la littérature démontre que les neurones corticaux transplantés répondent électrophysiologiquement ou métaboliquement à une stimulation sensorielle ou électrique de l'hôte (Grabowski et al., 1993a ; Santos-Torres et al., 2009) ou lors de l'exécution d'une tâche motrice (Ebrahimi-Gaillard et al., 1995) et présentent une activité de décharge spontanée (Senatorov et al., 1991).

Cependant, les mécanismes sous-tendant cette amélioration fonctionnelle n'étaient alors pas connus. Il a donc été émis l'hypothèse qu'elle faisait suite à une reconstruction anatomique des voies lésées ; et cette question a par la suite été largement étudiée.

Dans un premier temps, les études anatomiques ne permirent pas de mettre en évidence de reconstruction des voies lésées chez l'adulte, sinon partiellement (Circata et al., 1992 ; Schulz et al., 1993 ; Plumet et al., 1993). Ainsi, en 1992, Circata, réalise des greffes de fragments de cortex embryonnaire prélevés à E17 dans le cortex moteur de rats adultes préalablement lésés. S'il observe par des tests comportementaux une meilleure récupération fonctionnelle des animaux transplantés par rapport à ceux seulement lésés, l'étude anatomique des connexions entre l'hôte et le transplant n'était pas aussi concluante. En effet, le thalamus de l'hôte projette vers le transplant mais ces projections ne semblaient pas organisées topographiquement ; et les neurones transplantés ne semblaient pas envoyer de projections vers le thalamus de l'hôte. Il conclut donc que la reconstruction des voies lésées n'est pas possible ; l'amélioration fonctionnelle serait due à la présence de facteurs issus du transplant qui augmenteraient l'activité fonctionnelle du cortex adjacent (Circata et al., 1992). De la même manière, Schulz indique que les transplants embryonnaires (E14-E15) reçoivent des projections appropriées (le tissu embryonnaire est donc permissif à la repousse axonale), mais ne sont pas capables d'en développer en dehors de la greffe ; le cerveau mature ne serait donc pas permissif à la repousse axonale (Schulz et al., 1993).

D'autres études mettent en évidence une reconstruction partielle des voies lésées chez l'adulte, les projections émises par le transplant étant cependant peu denses et ne semblant pas atteindre les cibles éloignées du cortex moteur (Roger et Ebrahimi-Gaillard, 1994 ; Grabowski et al., 1995 ; Guitet et al., 1994 ; Sørensen et al., 1996). Certains envisagent alors la transplantation de tissu embryonnaire comme un outil intéressant pour réparer le cortex lésé, à condition de bloquer les facteurs inhibiteurs présents chez l'adulte (Roger et Ebrahimi-Gaillard, 1994).

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la mise en évidence des connexions entre l'hôte et le transplant a été, dans la plupart des cas, réalisée par injections de traceurs rétrogrades ou antérogrades. Par ailleurs, l'identification des transplants était réalisée par marquage au moment de la transplantation (par exemple avec des particules d'or), ou en ciblant des marqueurs spécifiques du transplant (Ebrahimi-Gaillard et al., 1994 ; Gaillard et al., 2004). Ces techniques

présentaient cependant des limites dans l'identification précise et complète du transplant et de ses projections.

Afin de surmonter ces limites techniques, la greffe, chez des souris sauvages, de tissu embryonnaire exprimant de manière ubiquitaire sous le contrôle du promoteur de l'actine- β , une protéine fluorescente verte, la GFP (Green Fluorescent Protein), apparaît comme un outil pertinent afin de mettre en évidence de manière indiscutable le transplant et l'ensemble des projections qu'il développe (Gaillard et al., 2004).

C'est ainsi que les travaux de Gaillard (Gaillard et al., 2007) ont permis une avancée majeure dans l'étude de la reconstruction des voies lésées dans le système nerveux mature. Le cortex moteur de souris adultes sauvages a été lésé par aspiration, et un fragment de cortex embryonnaire d'origine moteur prélevé à E14 et exprimant la GFP a été placé immédiatement dans la cavité lésionnelle. Après 8 semaines, les projections émises par le transplant ont été analysées : les neurones du transplant envoient des projections vers les cibles corticales et sous corticales appropriées de l'hôte, y compris à longue distance, jusqu'à la moelle épinière. De plus, ces projections respectent l'organisation topographique des projections corticales ; une partie des fibres sont myélinisées ; et des contacts synaptiques réciproques s'établissent entre l'hôte et le transplant. Ainsi, ce travail met en évidence la permissivité à la repousse axonale du CNS mature, et la possibilité de reconstruire point-à-point les voies motrices lésées chez l'adulte par transplantation de neurones corticaux embryonnaires (Figure 8).

Ces travaux ont dans un premier temps suscité l'intérêt voire l'interrogation auprès d'une partie de la communauté scientifique (Tuszynski, 2007) ; ils ont par la suite été confirmés. En effet, la reconstruction de la voie nigro-striée par les neurones dopaminergiques embryonnaires issus du mésencéphale ventral et transplantés dans la substance noire a été rapportée dans un modèle animal de la maladie de Parkinson (Gaillard et al., 2009 ; Thompson et al., 2009). Après transplantation de neurones embryonnaires corticaux chez l'adulte, il a été rapporté la présence de projections à longue distance vers des cibles spécifiques du cortex, mais aussi la présence de projections ectopiques qui pourraient entraîner des dysfonctionnements (Magavi et Lois, 2008). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que

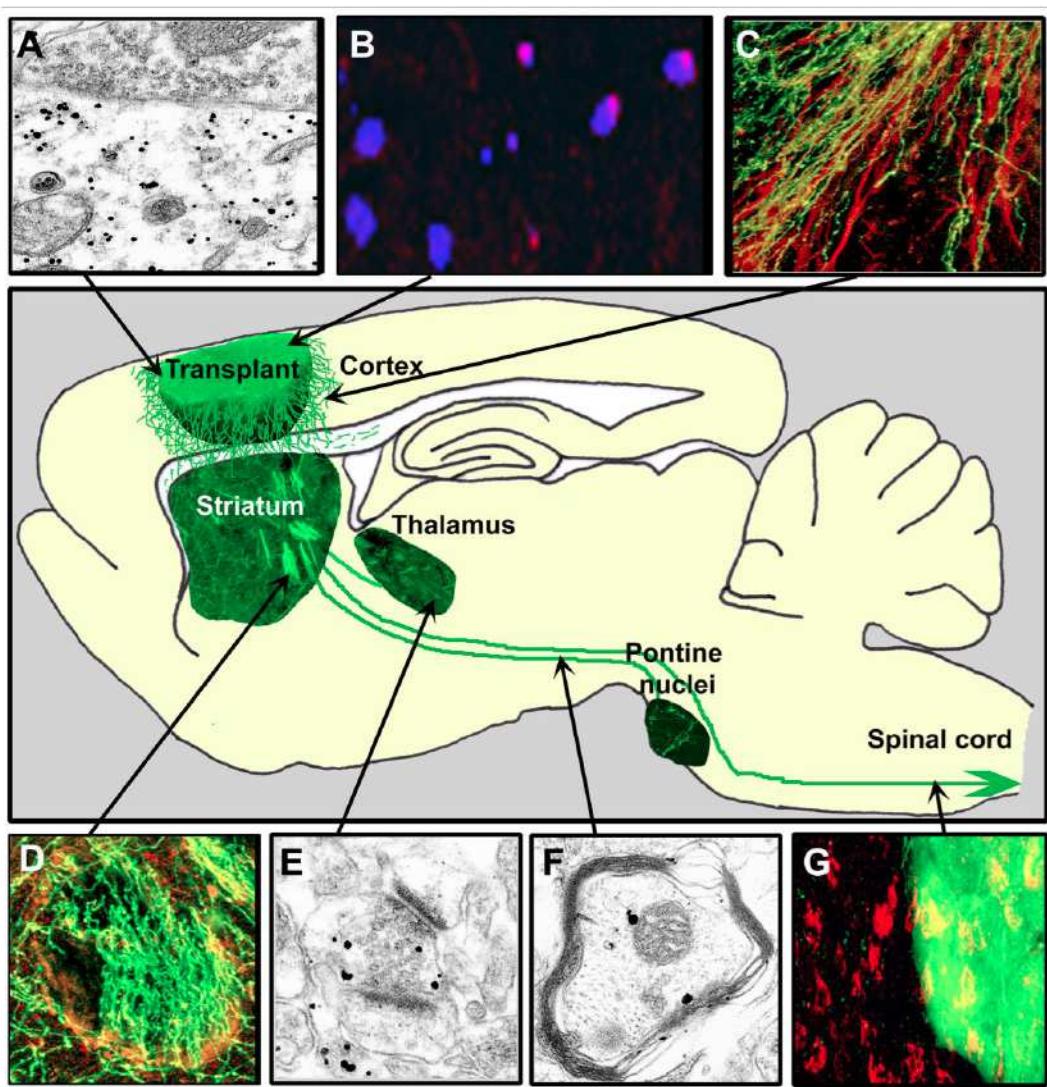


Figure 8 : Reconstruction anatomique des voies lésées après transplantation du cortex moteur embryonnaire dans le cortex moteur lésé chez la souris adulte. Au centre, le schéma représente la réinnervation point-à-point des voies motrices lésées. (A), (E), (F) Mise en évidence en microscopie électronique des contacts synaptiques établis entre l'hôte et les neurones transplantés au niveau du cortex, du thalamus et de la capsule interne. (B) Les noyaux (bleu) du transplant ne possèdent pas le chromosome Y (rouge) montrant l'absence d'une fusion avec les cellules de l'hôte contenant le chromosome Y. (C), (D) Les fibres GFP^+ innervent le cortex adjacent et le striatum. (G) Les cellules marquées par un traceur rétrograde injecté dans la moelle épinière sont présentes dans le transplant (jaune) et dans le cortex moteur adjacent (rouge). (D'après Gaillard et al., 2007).

les auteurs n'ont pas réalisé de lésion avant la transplantation, or nous savons que les projections développées par les neurones transplantés empruntent préférentiellement les voies en dégénérescence le long desquelles la sécrétion de molécules de guidage les orienterait (Gaillard et al., 2007).

3. *Composition cellulaire et organisation cytoarchitecturale des transplants*

Si les neurones transplantés sont capables de développer des projections respectant une organisation topographique normale, la composition cellulaire et l'organisation cytoarchitecturale du tissu greffé sont-elles semblables à celles du cortex en conditions normales ?

Une étude réalisée en 1986 conclut, sur la base de transplantation de fragments de tissu embryonnaire chez le rat nouveau-né, que l'organisation laminaire du transplant est conservée par rapport au cortex normal, bien que l'épaisseur des couches semble moindre. Lorsque les fragments sont placés en inversant leur orientation dorso-ventrale, le transplant développe une organisation laminaire inversée par rapport au cortex normal (Chang et al., 1986). Ainsi, l'organisation laminaire des transplants est conservée et semble intrinsèque. Cependant, si la lamination est présente au cœur des transplants, cela est beaucoup moins clair sur les bords des greffes. Cette perte de la lamination pourrait être due aux contraintes mécaniques imposées par la procédure de transplantation et plus intenses sur les bords du transplant (Chang et al., 1986).

A l'inverse, de nombreuses études mettent en évidence une perte de l'organisation laminaire normale dans les transplants, où la distribution cellulaire est soit diffuse, soit organisée en bandes ou en amas (« clusters ») séparés par des faisceaux de fibres (Castro et al., 1985 ; Plumet et al., 1990 ; Garnier et al., 1995 ; Pinaudeau et al., 2000 ; Gaillard et Roger, 2000 ; Santos-Torres et al., 2009).

Une question majeure au regard de l'efficacité des transplants à réparer le CNS lésé est la capacité des cellules embryonnaires transplantées à se différencier selon

le phénotype neuronal approprié. Si l'étude des connexions mises en place par les neurones transplantées met en évidence la présence de neurones à projection dont les afférences sont spécifiques, les données de la littérature présentent peu d'informations quant à la composition cellulaire des transplants de fragments embryonnaires corticaux. On retrouve dans les greffes des cellules pyramidales, non-pyramidales, et gliales (Belichenko et al., 2001). Des arguments penchent en faveur d'une organisation cellulaire conforme à celle du cortex normal puisqu'il a été démontré par électrophysiologie que le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur dans ce modèle de transplantation (Santos-Torres et al., 2009), et par immunohistochimie la présence de neurones de type GABAergique (Bragin et al., 1991 ; Santos-Torres et al., 2009) ainsi que de récepteurs glutamatergiques, cholinergiques et GABAergiques (Santos-Torres et al., 2009). En revanche, dans certains cas, la densité cellulaire dans les transplants serait globalement supérieure à celle de l'hôte (Bragin et al., 1991 ; Bragin et al., 1993), et la densité relative des neurones GABAergiques serait réduite (Bragin et al., 1993).

La question de l'évolution dans le temps du développement des transplants en terme de composition cellulaire et des projections établies vers l'hôte fait l'objet de la première étude présentée dans ce manuscrit.

4. Facteurs influençant le développement des neurones transplantés

Les résultats présentés dans la littérature concernant la survie, la croissance et l'organisation cellulaire des transplants, ainsi que le développement des projections par les neurones transplantés peuvent parfois sembler hétérogènes (même si pas forcément opposés). Cela peut s'expliquer en partie par la quantité de facteurs qui influencent la survie et le développement des greffes. Nous allons dans la section suivante présenter une partie de ces facteurs, avec un intérêt tout particulier pour l'effet d'un délai entre la lésion et la transplantation, et l'importance de la vascularisation. Ces deux points ont en effet été examinés dans la deuxième étude présentée dans ce manuscrit. Afin d'optimiser le potentiel thérapeutique de la

transplantation neuronale, il est en effet important de définir les conditions expérimentales optimales.

a) Age donneur / âge receveur

Nous avons dans la section précédente pu percevoir l'importance de l'âge du tissu à la fois greffé et receveur dans les expériences de transplantation.

Ainsi, en fonction de l'âge du tissu embryonnaire transplanté, il sera plus ou moins engagé dans une voie de différenciation, et sera plus ou moins sensible aux facteurs présents dans l'environnement où il sera transplanté. Les neurones corticaux semblant présenter le plus haut potentiel de croissance sont ceux prélevés entre E14 et E15 (Das et al., 1980), ce qui correspond au pic de neurogenèse des neurones à projection corticaux (pour revue, Molyneaux et al., 2007).

La plupart des études de transplantation sont réalisées chez le nouveau-né ou le jeune adulte, et seulement un nombre limité d'entre elles s'est intéressé à étudier la réceptivité du cerveau âgé à ces transplants. Pourtant, les phénomènes de plasticité, de régénération, et de repousse axonale sont influencés par le niveau de maturité du tissu receveur. Pour certains, passée la période péri-natale, l'âge du receveur ne semble plus avoir beaucoup d'influence (Hallas et al., 1980 ; Jin et al., 2010). Cependant, dans des modèles de transplantation de neurones corticaux (Eriksdotter-Nilsson et Olson, 1989), hippocampiques (Zaman et Shetty, 2002), ou striataux (Collier et al., 1999), des niveaux de survie, de croissance et de récupération anatomique et fonctionnelle moindres ont été rapportées chez la souris âgée (après 12 mois).

b) Présence ou absence d'une lésion

Des études réalisées il y a une vingtaine d'années ont montré que l'absence de lésion précédent la transplantation corticale chez le rat nouveau-né (Castro et al., 1985) ou adulte (Gibbs et Cotman, 1987) semble limiter la croissance du transplant et le développement de ses projections. Plus récemment, en 2007, ces résultats ont été confirmés par Gaillard et Jaber chez la souris adulte : l'absence de lésion ne

permet pas aux neurones corticaux transplantés de développer des projections, y compris vers les cibles proches comme le cortex ipsilatéral (Gaillard et Jaber, 2007).

Cela peut s'expliquer par l'absence de voies en dégénérescence laissées vacantes chez l'hôte du fait de la lésion. En effet, les fibres du transplant semblent préférentiellement emprunter les voies en dégénérescence pour étendre leurs projections. La réaction astrocytaire post-lésionnelle semble également impliquée dans ce phénomène. En effet, après lésion, les astrocytes réactifs de l'hôte auraient la capacité de réexprimer des facteurs trophiques (normalement exprimés pendant le développement) et guideraient les fibres développées par le transplant (Gaillard et Jaber., 2007). Ainsi, la régénération appropriée dans le CNS mature par les neurones transplantés dépendrait de facteurs exprimés le long des voies lésées.

c) Facteurs trophiques

Après lésion, de nombreux facteurs sont libérés par les neurones, les cellules immunitaires et les cellules gliales au niveau du site de lésion pour se protéger et tenter de favoriser la survie cellulaire et la réparation des voies lésées. Un certain nombre de facteurs ont été identifiés dans différents modèles de lésion. Par exemple, il a été rapporté après lésion corticale une augmentation des niveaux d'expression du GMFB (Glia Maturation Factor Beta) autour du site de lésion (Hotta et al., 2005) et une augmentation de sa libération dans la cavité lésionnelle (Nieto-Sampedro et al., 1988). Celui-ci est produit par les astrocytes en réaction à la lésion et induit la sécrétion de facteurs neurotrophiques comme le BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) et le NGF (Nerve Growth Factor) (Hotta et al., 2005). De même, après lésion corticale, les niveaux d'expression du FGF (Fibroblast Growth Factor) (Nieto-Sampedro et al., 1988), du GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) (Cheng et al., 2008) et du VEGF (Vascular Endothelial Growth factor) (Sköld et al., 2005) sont augmentés.

Partant de ce principe, un certain nombre d'équipes s'est intéressé à l'effet de l'administration de tels facteurs au niveau du site de lésion dans différents modèles. Par exemple, la surexpression du VEGF-A a un effet neuroprotecteur après ischémie corticale puisqu'elle favorise la survie neuronale et réduit la taille de la

lésion. Ceci se traduit par une amélioration fonctionnelle significative par rapport aux souris non traitées (D'Onofrio et al., 2011).

Enfin, il semblerait que combiner l'administration de facteurs trophiques à la transplantation pourrait favoriser la survie des cellules greffées. Dans une série de travaux, après lésion ischémique, Lee et al., (Lee et al., 2007 ; Lee et al., 2009 ; Lee et al., 2010) réalisent des expériences de transplantation dans le cortex de cellules souches neurales humaines (hNSCs) qui surexpriment le GDNF, le VEGF ou le BDNF. Dans ces conditions, les cellules transplantées se différencient en neurones ; leur survie et les améliorations fonctionnelles qu'elles induisent sont augmentées par rapport aux hNSCs ne surexprimant pas ces facteurs.

d) Délai entre la lésion et la transplantation neuronale

Il apparaît qu'introduire un délai entre la lésion et la transplantation favorise la survie et le développement du transplant (Nieto-Sampedro et al., 1983, Gibbs et Cotman, 1987 ; Gonzalez et Sharp, 1987 ; Grabowski et al., 1994). Avec un modèle de lésion ischémique par occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO), Grabowski rapporte un effet similaire avec des délais de 5-7 jours ou de 8 semaines ; et les conditions seraient les plus favorables avec un délai de 3 semaines. Cependant, d'autres études indiquent que des délais courts seraient préférables puisqu'il semblerait que l'effet soit maximum lorsque le délai coïncide avec le moment où la libération de facteurs neurotrophiques par les astrocytes autour de la lésion est maximale ; soit 9 jours dans le modèle de transplantation de tissu embryonnaire striatal dans le cortex entorhinal utilisé par les auteurs (Nieto-Sampedro et al., 1983). De même, la récupération fonctionnelle à des tests de mémorisation spatiale suite à une lésion du cortex frontal médian était meilleure lorsque la transplantation était réalisée 7 ou 14 jours après la lésion ; les transplantations réalisées 30 ou 60 jours après la lésion n'ayant pas d'effet (Stein et al., 1988). Il a alors été émis l'hypothèse que l'introduction d'un délai entre la lésion et la transplantation permettrait : la néoformation de vaisseaux, la libération par les astrocytes de facteurs trophiques autour de la lésion et dans la cavité lésionnelle, et la diminution des niveaux de neurotoxiques produits suite à la lésion (Gonzalez et Sharp, 1987).

e) Vascularisation des neurones transplantés

En conditions pathologiques, des phénomènes de néoangiogenèse (extension de l'arbre vasculaire à partir de vaisseaux pré-existants) et de néo-vasculogenèse (formation *de novo* de vaisseaux sanguins) sont induits sous l'influence de facteurs tels que le VEGF, le FGF et les angiopoïétines (pour revue, Xiong et al., 2010). Il a été montré récemment, dans un modèle de lésion de la moelle épinière, que la néoangiogenèse post-traumatique est un phénomène dynamique et transitoire qui présente un pic d'intensité une semaine après la lésion. De plus, la repousse axonale est plus importante et plus rapide à proximité des vaisseaux sanguins (Dray et al., 2009).

L'importance de la vascularisation des transplants, qui permet un apport en oxygène et en composés métaboliques, a été pressentie dès les travaux de Dunn (Dunn, 1917), et largement confirmée depuis. Les vaisseaux sanguins présents dans les transplants proviennent à la fois de l'hôte et du greffon ; et l'interaction entre les cellules endothéliales de l'hôte et du transplant est primordiale pour l'établissement d'un réseau vasculaire fonctionnel. Aussi, dans un premier temps, la survie du tissu greffé dépend largement de l'apport sanguin qu'il reçoit du tissu hôte. Dans un second temps, les cellules endothéliales du transplant participent à la vascularisation, et la formation d'anastomose permet de réunir les vaisseaux des deux origines (Krum et Rosenstein, 1988). Les données temporelles concernant la vascularisation des transplants sont variables d'une étude à l'autre, et notamment selon que la transplantation soit sous forme de bloc ou de suspension cellulaire (Dusart et al., 1989 ; Grabowski et al., 1992 ; Pennel et Streit, 1997). Il n'apparaît pas non plus clairement si l'organisation du réseau vasculaire dans les transplants est comparable à celle de l'hôte (Krum et Rosenstein, 1989 ; Senatorov et al., 1991), ou si sa densité est moindre (Grabowski et al., 1992).

Par ailleurs, il a été démontré que l'implantation des transplants dans des sites hautement vascularisés, tels que le plexus choroïde ou la chambre antérieure de l'œil, favorise leur survie (Olson et al., 1982 ; Stenevi et al., 1976). De plus, la transplantation préalable d'un iris, qui possède une riche vascularisation, forme un

« lit vasculaire artificiel » et favorise la survie des cellules transplantées (Stenevi et al., 1976).

De plus, il a été démontré dans des modèles de la maladie de Parkinson qu'accroître la vascularisation des neurones embryonnaires dopaminergiques transplantés soit pharmacologiquement (Finger et Dunnett, 1989), soit en faisant surexprimer aux cellules greffées du VEGF, favorise leur développement et leur survie (Casper et al., 2002 ; Lee et al., 2007).

Pour conclure, la transplantation de neurones embryonnaires permet de comprendre des mécanismes fondamentaux liés au développement ainsi qu'aux mécanismes de réparation cérébrale. Elle a permis de mettre en évidence le potentiel longtemps sous-estimé (notamment chez l'adulte) des thérapies cellulaires dans le cadre de lésions du SNC. Des études cliniques utilisant des cellules embryonnaires neuronales ont d'ailleurs été réalisées, notamment chez des patients Parkinsoniens, et mettent en évidence un certain effet bénéfique de ces greffes chez une partie des patients. Cependant, la transplantation de neurones embryonnaires pose un certain nombre de problèmes. Tout d'abord, elle soulève des questions éthiques, puisque le tissu prélevé provient de fœtus abortifs, d'autant plus que le nombre de fœtus nécessaires pour chaque patient est élevé (il faut par exemple 6 fœtus pour traiter un patient parkinsonien). D'autre part, le prélèvement, la préparation, et l'implantation de tissu embryonnaire représentent des difficultés logistiques importantes.

Pour ces raisons, des sources alternatives de neurones ont été envisagées et, ces dernières années, les études de thérapies cellulaires basées sur l'utilisation de cellules souches, ou plus récemment de cellules pluripotentes induites (iPSCs pour « induced pluripotent stem cells ») se sont multipliées.

C. Transplantation de neurones dérivés de cellules souches

1. Généralités sur les cellules souches

Une cellule souche est une cellule non différenciée qui possède des capacités d'auto-renouvellement théoriquement infinies, et qui peut se différencier pour donner des cellules spécialisées. Classiquement, elles peuvent être subdivisées en deux groupes. Les cellules souches embryonnaires (ESCs pour « embryonic stem cells ») sont dérivées du blastocyste et sont pluripotentes, c'est à dire capables de donner naissance à tous les types cellulaires, à l'exception des cellules germinales.

Les cellules souches organe ou tissu spécifiques dérivent des ESCs et sont multipotentes, c'est à dire capables de donner naissance à différents types cellulaires mais restreints à un lignage cellulaire donné. Ces dernières sont présentes durant la vie embryonnaire, mais également chez l'adulte (pour revue, Anderson et al., 2001).

Les cellules souches peuvent se diviser par divisions symétriques (elles donnent alors naissance à deux cellules souches) ou par divisions asymétriques (elles donnent alors une cellule souche et une cellule dite « engagée » vers un lignage spécifique). Les cellules « engagées » sont appelées précurseurs ou progéniteurs. Ils peuvent continuer à proliférer afin d'augmenter le nombre de cellules disponibles ; on les appelle alors « transit amplifying cells » pour cellules s'amplifiant transitoirement. Enfin, ils se différencient en cellule mature spécifique. On considère qu'il existe une relation inverse entre le « potentiel » d'une cellule, et son niveau de spécification ou de différenciation (Figure 9).

Cependant, la notion de restriction du lignage des cellules souches organe ou tissu spécifiques a été remise en question par des expériences mettant en évidence les phénomènes de « transdifférenciation » et de « transdétermination » qui

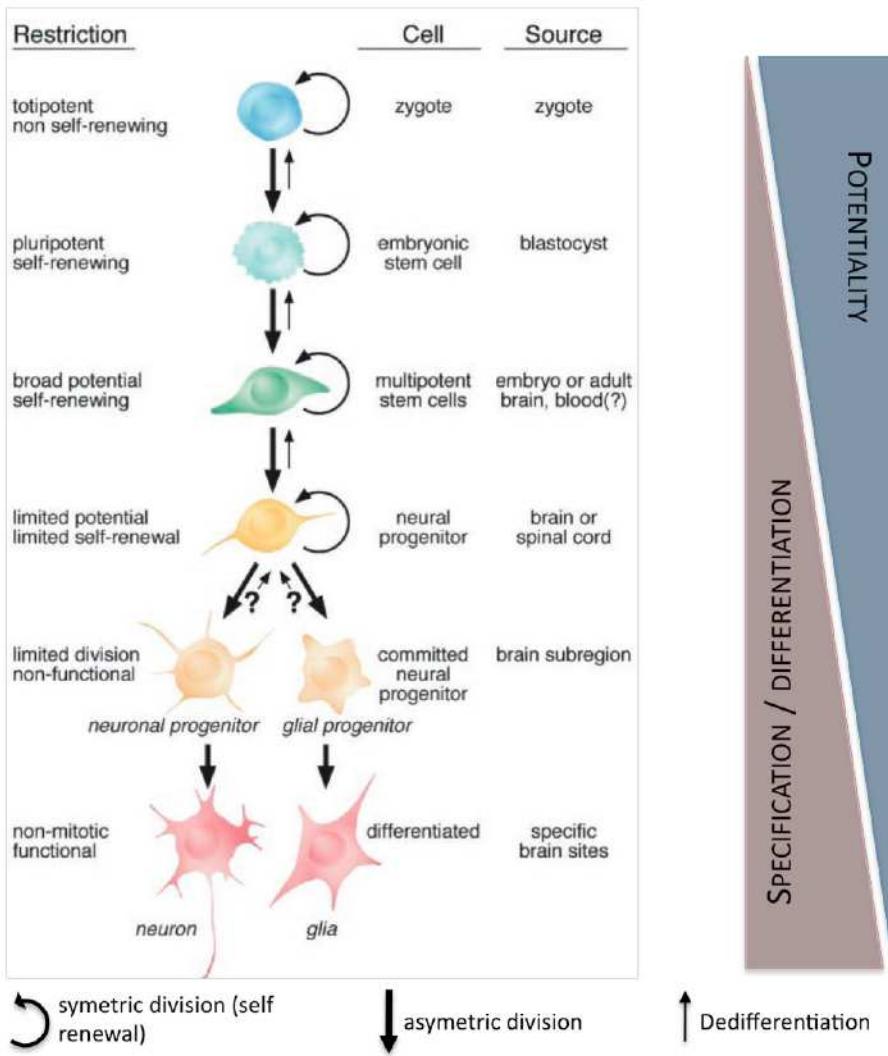


Figure 9 : Origine des cellules souches permettant la génération de cellules neurales. Le niveau de potentiel des cellules est inverse à leur niveau de spécification. (D'après Gage, 2000).

permettent à des cellules différenciées ou à des cellules souches tissu spécifiques adultes issues d'un organe de changer d'identité et de produire des cellules d'un autre organe. Il s'agit là d'une conversion directe puisque les cellules sont reprogrammées sans passer par un stade intermédiaire pluripotent. Plus récemment encore, en 2006 et 2007, des cellules souches pluripotentes ont pu être générées artificiellement à partir de cellules somatiques adultes en forçant l'expression de certains gènes, dits de pluripotence (Takahashi et Yamanaka, 2006) (Figure 10). Ces iPSCs sont semblables aux ESCs en terme de morphologie, de propriétés de croissance, des marqueurs qu'elles expriment et par leur activité télomérase élevée. Elles sont capables de se différencier et doivent de même être reprogrammées vers

un lignage cellulaire spécifique avant d'être utilisées dans le cadre d'études de transplantation par exemple. L'un des obstacles majeurs à leur utilisation est leur propension à former des tumeurs. Ainsi, certains groupes essaient de trouver des alternatives à la voie classique de génération des iPSCs par transfection de gènes associés aux cellules souches tels que Oct-3/4 ou Sox2 (Takahashi et Yamanaka, 2006) ; par exemple, en reprogrammant les cellules à l'aide de protéines recombinantes qui pénètrent dans les cellules (Zhou et al., 2009).

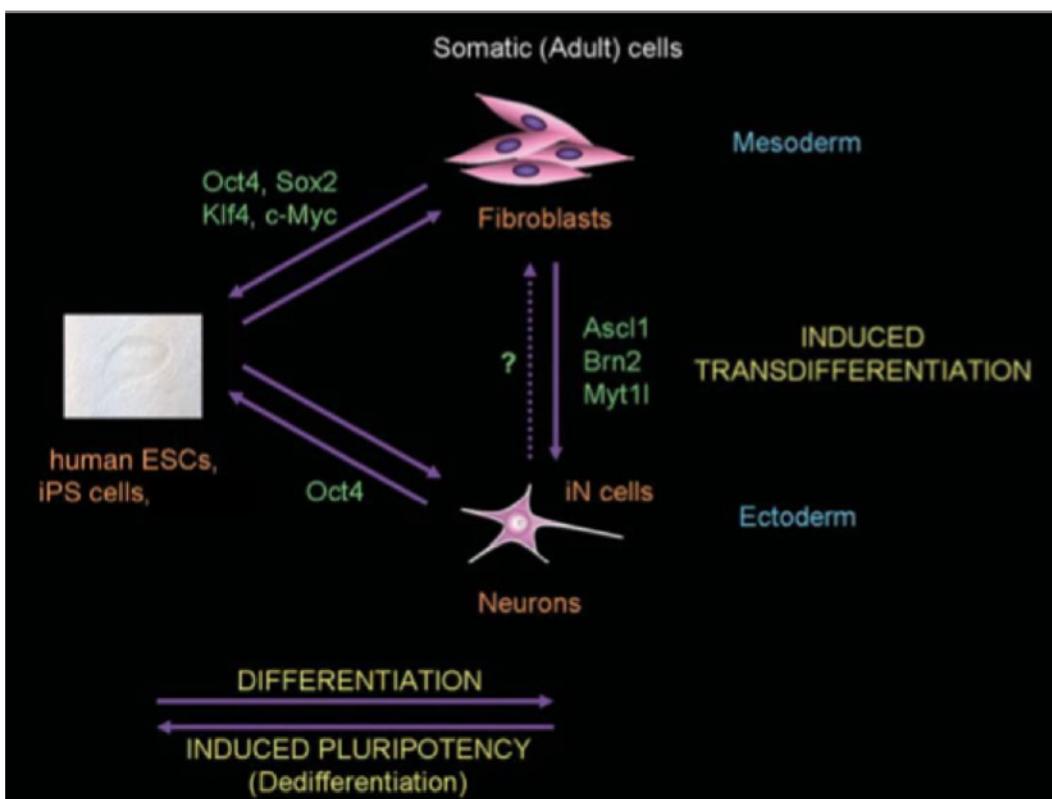


Figure 10 : Déterminisme neural par transdifférenciation ou après reprogrammation. Le schéma représente les mécanismes du processus de différenciation (de gauche à droite) à partir de cellules souches embryonnaires ou induites (de droite à gauche). La transdifférenciation de cellules somatiques comme les fibroblastes en cellules neurales (de haut en bas) est directe, et ne passe pas par le stade « souche » ; les facteurs impliqués dans la conversion miroir (de bas en haut) n'ont pas encore été décrits. (D'après Masip et al., 2010).

La génération de neurones dérivés de cellules souches embryonnaires ou induites permet d'avancer dans la compréhension des mécanismes développementaux et de spécification neuronale et ouvre de nouvelles perspectives

thérapeutiques dans les domaines de modélisation de pathologies cérébrales et de réparation cérébrale avec l'espoir de pouvoir générer un nombre illimité de neurones de tous types. Dans les sections suivantes, nous présenterons les travaux de recherche portant sur la génération et la transplantation de neurones corticaux dérivés de ESCs ou iPSCs murines ou humaines.

2. Génération et transplantation de neurones corticaux à partir de cellules souches

Potentiellement, les cellules souches pourraient permettre de recréer *in vitro* tous les types cellulaires. La possibilité d'induire un phénotype neuronal à partir d'ESCs a ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le domaine de la réparation cérébrale basée sur les thérapies cellulaires. La complexité due à la diversité des populations neuronales et des connexions établies dans le CNS complique la tâche en vue d'une application clinique mais de récentes études prometteuses laissent espérer la possibilité de recréer des populations cérébrales, par exemple corticales, *in vitro* (Au et Fishell, 2008 ; Eiraku et al., 2008 ; Gaspard et al., 2008 ; Gaspard et al, 2009a ; Gaspard et al., 2009b). En rapport avec la problématique de la génération de neurones corticaux, dans un premier temps, des études ont rapporté la possibilité de générer une population homogène de progéniteurs de neurones du cerveau antérieur (Bibel et al., 2004 ; Watanabe et al., 2005). Les cellules souches sont induites vers une identité neurale par l'ajout d'acide rétinoïque, et les cellules de la glie radiaire ainsi générées se différencient en neurones, la plupart pyramidaux ; après des temps de culture plus longs, une faible proportion d'interneurones est également générée (Bibel et al., 2004).

Plus récemment, le groupe de P. Vanderhaegen, a développé un protocole permettant de générer *in vitro* des neurones corticaux à partir d'ESCs de souris, qui miment les principales étapes de la corticogenèse et la diversité neuronale corticale. En se basant sur le modèle de spécification neurale par défaut, les auteurs ont induit une spécification neurale des ESCs en les cultivant dans un milieu dépourvu de sérum ou de morphogènes. Afin d'induire une « identité caudale » des progéniteurs ainsi générés, ils ont bloqué la voie de signalisation Sonic Hedgehog (SHh) et ont

obtenu une population homogène de progéniteurs neuronaux exprimant des marqueurs corticaux. L'analyse des neurones dérivés de ces progéniteurs révèle que, comme dans le cortex, la plupart expriment des marqueurs des neurones pyramidaux corticaux tels que les transporteurs vésiculaires du glutamate VGLUT1 et VGLUT2, tandis qu'une minorité sont des interneurones GABAergiques, et aucun n'exprime de marqueurs non-corticaux. De plus, la majorité des neurones générés présente une morphologie pyramidale ou unipolaire caractéristique des neurones glutamatergiques corticaux, et une minorité a une morphologie multipolaire typique des interneurones corticaux. Enfin, par enregistrement électrophysiologique *in vitro* en patch-clamp, il a été démontré que les potentiels d'action spontanés et les courants post-synaptiques des neurones corticaux générés *in vitro* correspondent également à leur phénotype GABAergique ou glutamatergique. Les neurones générés expriment séquentiellement les différents marqueurs spécifiques des sous-types de neurones pyramidaux des différentes couches (reelin, Tbr1, Otx1,Ctip2, Satb2 puis Cux1), avec cependant une sous-représentation des neurones des couches superficielles mais selon une séquence temporelle semblable à celle retrouvée pendant la corticogenèse. La transplantation de ces neurones dans le cortex frontal chez la souris nouveau-né a permis de mieux les caractériser. Après un temps de survie d'un mois, les neurones transplantés expriment des marqueurs moléculaires des neurones pyramidaux, présentent des caractéristiques morphologiques de neurones pyramidaux matures, et envoient des projections selon un schéma semblable à celui des efférences corticales et plus précisément vers les cibles du cortex visuel. Ce profil de projections ne semble pas être guidé par des facteurs environnementaux (de l'hôte), puisque les greffes ont été réalisées dans le cortex frontal, mais il semblerait plutôt que les cellules aient acquis un phénotype spécifique de type « cortex visuel » (Gaspard et al., 2008 ; Gaspard et al, 2009a ; Gaspard et al., 2009b).

Parallèlement, une autre équipe a confirmé la possibilité de générer *in vitro*, à partir de cellules souches embryonnaires murines ou humaines, différents sous types de neurones corticaux fonctionnels selon une séquence spatio-temporelle mimant celle s'établissant *in vivo*. De plus, de manière intéressante, l'identité « régionale » des progéniteurs générés *in vivo* semble pouvoir être contrôlée

sélectivement. Par exemple, conformément à son rôle *in vivo*, la modulation du signal Fgf8, modifie l'identité rostro-caudale des neurones générés *in vitro* (Eiraku et al., 2008).

En 2010, une équipe décrit la possibilité de générer à partir de ESCs murines (mESCs) des précurseurs de neurones à projection corticaux qui, une fois transplantés dans le cortex moteur, somatosensoriel ou visuel de souris postnatales, se différencient et émettent des projections organisées somatotopiquement vers les cibles corticales et sous-corticales appropriées selon le site de transplantation, et forment des connexions synaptiques avec l'hôte (Ideguchi et al., 2010).

La possibilité de générer des neurones corticaux à partir d'ESCs humaines (hESCs) a également été rapportée par d'autres auteurs, mais l'identité exacte des neurones générés n'est pas complètement éclaircie. Précisément, leur intégration *in vivo* et les profils de projection de ces neurones n'ont pas été évalués (Li et al., 2009 ; Zeng et al., 2010 ; Shi et al., 2012). Cette question a été évaluée dans notre 3^e étude.

Ces résultats sont encourageants, et montrent qu'avec des protocoles parfois étonnement peu complexes, différents groupes ont réussi à générer des neurones corticaux à partir de cellules souches embryonnaires de souris ou humaines. Cependant, plusieurs questions restent en suspens.

Tout d'abord, dans les études présentées par Gaspard et Eiraku, il semble plus compliqué de « recréer » *in vitro* les événements tardifs de la corticogenèse puisque la proportion de neurones des couches superficielles est moindre. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les populations de neurones générés précocement dérivent de la VZ, tandis que les populations suivantes dérivent de la SVZ ; or il s'agit de deux populations de progéniteurs qui présentent des différences fondamentales et les modèles développés *in vitro* ne permettraient pas de générer correctement la SVZ. De façon intéressante, il a été démontré récemment que le traitement des mESCs par un inhibiteur des histones déacétylases, l'acide valproïque, permettrait d'augmenter la proportion de neurones des couches superficielles (Juliandi et al., 2012).

Par ailleurs, Ideguchi, semble avoir réussi à constituer une population cellulaire semblable à des progéniteurs corticaux au stade E12-E13 qui, selon l'environnement dans lequel ils sont transplantés, établissent des projections et contacts synaptiques adaptés selon le profil attendu pour la région où ils sont transplantés. Les résultats des expériences de transplantation présentés sont réalisés chez la souris nouveau-né, et vont dans le sens des résultats obtenus dans le cas de transplantations hétérotopiques de fragments de tissu embryonnaire prélevés à E12 (Pinaudeau et al., 2000). Il serait cependant intéressant de voir si, de la même manière, chez l'adulte, les projections pourraient s'établir, mais également être ainsi «dirigées » par des signaux présents dans l'environnement que constitue l'hôte.

Un autre point crucial concerne la propension des ESCs à former des tumeurs. Ce risque semble contrôlé dans le cas d'expériences de transplantation dans un environnement immature (chez le nouveau-né) où il est possible que les facteurs exprimés limitent la tumorigénèse comparativement au SNC adulte. De plus, le développement de tumeurs dépendrait du stade de maturation des cellules transplantées (Ideguchi et al., 2010).

Enfin, la question de la capacité de ces cellules à induire une récupération fonctionnelle se pose également.

En conclusion, l'utilisation d'ESCs présente de nombreux atouts, tels que la possibilité de générer une quantité théoriquement illimitée de neurones spécifiques. Mais elle souffre également de certaines limites : d'une part, du fait de la variabilité de la capacité des différentes lignées d'hESC utilisées à générer du tissu neural puisque bien qu'elles expriment à l'état indifférencié des niveaux semblables de marqueurs communs tels que Oct4 ou Nanog, les niveaux d'expression de marqueurs spécifiques de l'endoderme, du mésoderme ou de l'ectoderme varient selon les différentes lignées lors de leur différenciation (Osafune et al., 2008) ; d'autre part, si les principales étapes de la corticogenèse chez l'humain sont connues, il manque parfois de références auxquelles comparer le développement des neurones générés à partir des hESCs en laboratoire ; et enfin, apparaissent des questions éthiques et logistiques (bien que moindres comparées aux cellules

embryonnaires) puisque l'utilisation des hESCs dépend de la disponibilité de blastocystes humains surnuméraires.

Le développement de neurones à partir de cellules somatiques reprogrammées représente alors une solution alternative, avec l'avantage de prélever les cellules directement sur le patient à traiter et d'éviter ainsi les problèmes de rejet et de proposer des neurones patient-spécifiques avec le même fond génétique.

Aussi, depuis la découverte récente de la possibilité de reprogrammer des cellules somatiques en cellules pluripotentes (Takahashi et Yamanaka, 2006), la course à la génération de neurones « à la carte » à partir des iPSCs est lancée.

Ainsi, des motoneurones spinaux (Dimos et al., 2008 ; Ebert et al., 2009 ; Hu et Zhang, 2009), des cellules rétinienques (Osakada et al., 2009), ou encore des neurones dopaminergiques (Wernig et al., 2008 ; Hargus et al., 2009) ont été créés.

En ce qui concerne les neurones corticaux, en se basant sur les résultats obtenus à partir d'ESCs, quelques auteurs rapportent la possibilité de générer des cellules neuroépithéliales à partir d'iPSCs, et d'induire leur différenciation en neurones corticaux glutamatergiques (Zeng et al., 2010 ; Shi et al., 2012). Les neurones sont générés selon une séquence temporelle semblable à celle observée *in vivo*, forment des synapses fonctionnelles, et acquièrent des propriétés électrophysiologiques de neurones corticaux matures. De plus, toutes les phases (précoce et tardive) de la corticogenèse sont reproduites dans le modèle présenté (Shi et al., 2012). Cependant, l'intégration et le développement de ces neurones *in vivo* n'a pas été étudiée, et leur identité région-spécifique reste méconnue. Ces points sont abordés dans la troisième étude présentée dans ce manuscrit.

Enfin, tout comme dans le cas des ESCs, la question de la fonctionnalité des neurones dérivés d'iPSCs se pose, et la « sécurité » de leur utilisation, notamment du fait de leur potentiel tumorigène, doit être évaluée avant d'envisager toute approche clinique ; d'autant plus que la reprogrammation des cellules est le plus souvent basée sur l'induction de gènes dont l'oncogène Myc.

III. La neurogenèse chez l'adulte et ses potentielles applications à la réparation cérébrale

A. Généralités sur la neurogenèse adulte

La neurogenèse, définie comme le processus qui permet de générer des neurones matures fonctionnels à partir de précurseurs, a longtemps été considérée comme ne survenant qu'aux stades développemental et périnatal. En effet, depuis les travaux fondateurs de l'histologiste Santiago Ramon y Cajal au début du XX^e siècle, dominait l'idée que l'équilibre des réseaux neuronaux extrêmement complexes établis pendant le développement reposait sur leur stabilité, notion opposée à la neurogenèse. Ce dogme a été aboli suite aux travaux pionniers de Joseph Altman qui, en 1965, grâce à l'utilisation de [³H]-thymidine afin de marquer les cellules en prolifération, mit en évidence la présence de nouveaux neurones dans l'hippocampe du rat adulte (Altman and Das, 1965). Cependant, la communauté scientifique resta sceptique jusqu'aux travaux de Goldman et Nottebohm qui, en étudiant les bases neurologiques du chant des oiseaux, renforcèrent les preuves de la persistance d'événements neurogéniques chez l'adulte (Goldman et Nottebohm, 1983). Au début des années 1990, des cellules souches neurales (NSCs pour neural stem cells) furent isolées à partir de cerveaux de mammifères adultes et expandues *in vitro* (Reynolds et Weiss, 1992). Enfin, il a été démontré que la neurogenèse avait lieu *in vivo* chez les mammifères et générait de nouveaux neurones de manière continue dans des régions spécifiques du CNS adulte. En effet, même si à ce jour

des NSCs ont été isolées à partir de nombreuses régions cérébrales (pour revue, Gottlieb, 2002), ces résultats sont controversés (pour revue, Gould, 2007), et il est communément admis que la neurogenèse adulte est un phénomène localisé essentiellement dans deux niches neurogéniques principales : la zone sous ventriculaire (SVZ) qui borde les ventricules latéraux, et la zone sous granulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe (pour revue, Ming et Song, 2005) (figure 11).

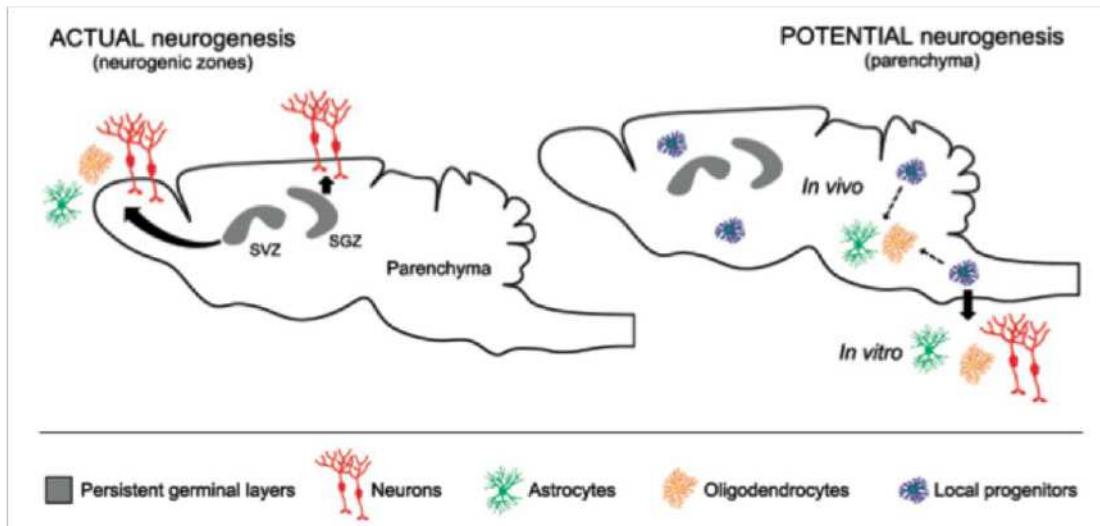


Figure 11 : La neurogenèse adulte chez les mammifères est constitutive dans deux niches neurogéniques principales : la SGZ du gyrus denté de l'hippocampe, et la SVZ qui borde les ventricules latéraux. Plus récemment, des progéniteurs neuraux ont été isolés dans d'autres régions cérébrales et peuvent, *in vitro*, générer des neurones ; *in vivo*, ils ne produiraient pas de neurones en conditions physiologiques, mais pourraient être activés en conditions pathologiques par exemple. (*D'après Ponti et al., 2010*).

La neurogenèse a dans un premier temps été mise en évidence chez de nombreuses espèces de mammifères, y compris le primate non-humain (Gould et al., 1999). La démonstration de sa persistance dans le cerveau adulte humain (Eriksson et al., 1998) a ouvert de nouvelles perspectives dans la recherche sur la modélisation et le traitement des pathologies cérébrales.

Ainsi, si le rôle de la neurogenèse dans les phénomènes de plasticité ou d'apprentissage et de mémorisation est bien décrit, la question de son potentiel pour la réparation cérébrale est ouverte. En effet, les patients souffrant de lésions

cérébrales ne montrent pas de récupération spontanée, ou alors de manière marginale. Aussi, la possibilité d'exploiter les NSCs présentes au sein du SNC adulte offrirait de nouvelles perspectives dans le domaine de la réparation cérébrale.

Parmi les deux zones neurogéniques cités précédemment, la SVZ semble présenter le plus haut potentiel dans le cadre de thérapies cellulaires les mobilisant. En effet, les cellules souches de la SVZ sont multipotentes et leur capacité d'auto-renouvellement est illimité (Weiss et al., 1996 ; Doetsch et al., 1999). De plus, le nombre de neurones générés dans la SVZ est supérieur à celui de la SGZ : on estime chez le rat qu'entre 30000 et 80000 nouveaux neurones y sont formés chaque jour (Kaplan et al., 1985), contre « seulement » 9000 dans l'hippocampe (Cameron et McKay, 2001). Enfin, les cellules générées dans la SVZ présentent un potentiel de migration intéressant puisqu'elles migrent en conditions physiologiques sur plusieurs millimètres jusqu'au bulbe olfactif tandis que les cellules de la SGZ ne parcourent que quelques micromètres entre leur lieu de naissance et la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (Gould et Cameron, 1996).

Dans la suite de ce chapitre, nous nous focaliserons donc sur la neurogenèse au sein de la SVZ et ses potentielles applications à la réparation cérébrale.

B. Le système SVZ-RMS-OB

1. Généralités

Chez le rongeur adulte, en conditions physiologiques, les cellules souches de la SVZ donnent continuellement naissance à des précurseurs qui migrent rostralement en direction du bulbe olfactif (OB pour olfactory bulb). Cette migration tangentielle en chaîne se fait le long d'une voie bien définie : le flux rostral migratoire (RMS pour rostral migratory stream) (Lois et al., 1996). Lorsqu'ils ont atteint le bulbe olfactif, les neuroblastes immatures se détachent du RMS et adoptent une migration radiaire jusqu'à leur position finale dans la couche

granulaire (GCL pour granule cell layer) ou la couche glomérulaire où ils se différencient en neurones matures (pour revue, Whitman et Greer 2009) (Figure 12).

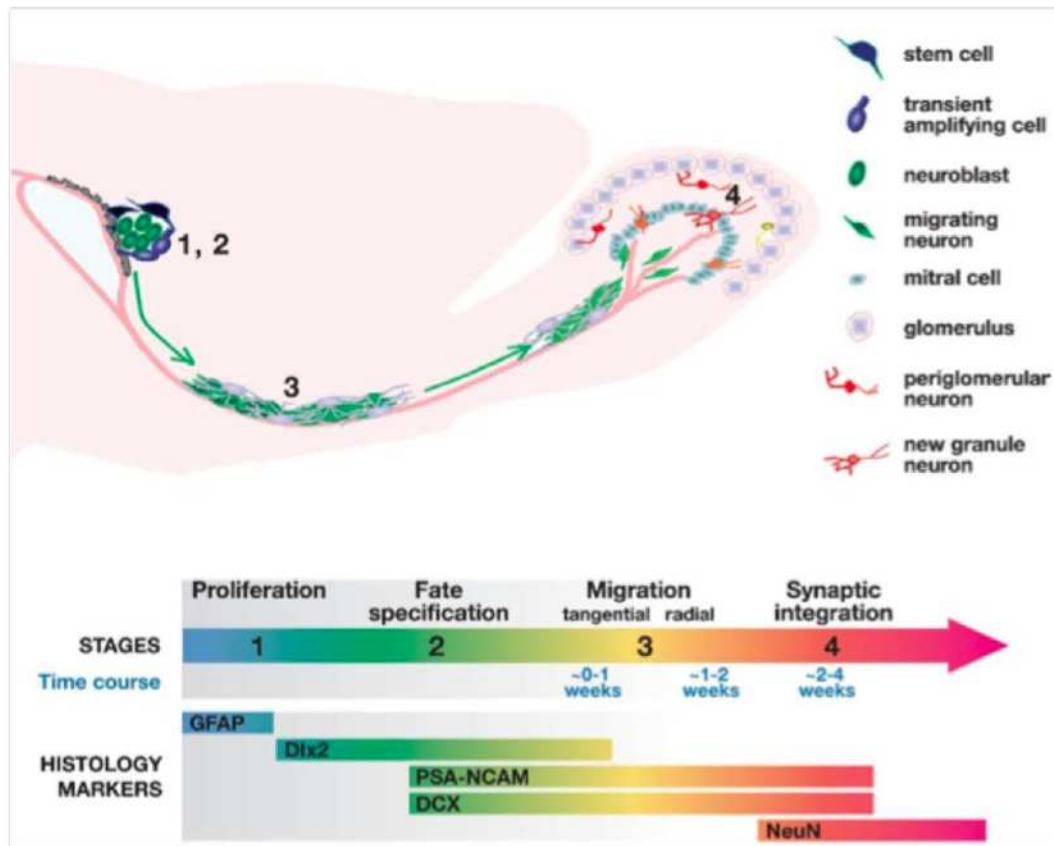


Figure 12 : Génération des interneurones bulbaires par les cellules souches de la SVZ. Cette neurogenèse se déroule suivant 4 étapes : (1) les cellules souches (en bleu) de la SVZ se divisent et génèrent des précurseurs qui eux mêmes prolifèrent (2) les précurseurs (en bleu clair) se différencient en neuroblastes immatures (en vert) (3) les neuroblastes immatures migrent en chaîne le long du RMS vers le bulbe olfactif, où ils migrent radiairement vers leur couche cellulaire (4) les neuroblastes se différencient en neurones matures de la couche granulaire (orange) ou périglomérulaire (rouge). Des marqueurs spécifiques sont exprimés transitoirement par les cellules pendant ces différents stades. (*D'après Ming et Song, 2005*).

La plupart des neurones ainsi générés sont des interneurones GABAergiques. La grande majorité (95%) sont des interneurones de la couche granulaire, et les autres sont des interneurones de la couche péri-glomérulaire (pour revue, Lledo et al., 2006). Les interneurones de la couche péri-glomérulaire peuvent être subdivisés

en trois catégories selon leur immunoréactivité à la tyrosine hydroxylase (TH), la calbindine et la calretininine (pour revue, Lledo et al., 2008).

Environ la moitié des neurones issus de la neurogenèse secondaire sont éliminés dans les semaines suivant leur naissance (Winner et al., 2002) tandis que l'autre moitié s'intègre fonctionnellement aux réseaux pré-existants ; cependant, leur rôle précis reste encore flou (pour revue, Whitman et Greer 2009).

Notons par ailleurs que la SVZ postnatale est sporadiquement à l'origine d'oligodendrocytes immatures qui migrent vers le corps calleux ou le striatum où ils se différencient en oligodendrocytes matures (pour revue, Jackson et Alvarez-Buylla, 2008).

2. *Organisation et composition cellulaire de la SVZ*

La SVZ est une fine région qui borde les ventricules latéraux. Elle apparaît pendant le développement et persiste à l'âge adulte, constituant alors l'une des deux niches neurogéniques majeures puisqu'elle retient la capacité de générer continuellement des neurones et des cellules gliales. Elle est composée de trois principaux types cellulaires désignés comme les cellules de type A, B et C (Doetsch et al., 1997 ; pour revue, García-Verdugo et al., 1998 ; pour revue, Mirzadeh et al., 2008). La SVZ est séparée du ventricule par une couche de cellules épendymaires, les cellules de type E (pour revue, Jackson et Alvarez-Buylla, 2008) (Figure 13).

Les cellules de type B sont les « vraies » cellules souches de la SVZ. Elles ont un rythme de prolifération lent (pour revue, Lledo et al., 2008), sont multipotentes, ont des capacités d'autorenouvellement illimité, expriment des marqueurs de cellules souches telles que la nestine, et sont à l'origine de neurosphères multipotentes *in vitro* (Doetsch et al., 1999). Ainsi, dans un élégant travail en 1999, Doetsch a mis en évidence leur capacité à régénérer la SVZ après élimination des précurseurs immatures et des neuroblastes de la SVZ par un traitement à l'Ara-C, une molécule anti-mitotique (Doetsch et al., 1999).

Les cellules de type B présentent des caractéristiques morphologiques (forme étoilée) et immunohistochimiques (notamment l'expression de la GFAP) d'astrocytes, et ont de ce fait été définies comme étant des astrocytes (Mirzadeh et al., 2008). Cependant, elles ne sont pas identiques aux astrocytes du parenchyme adulte. Ces derniers ne présentent en effet aucune activité proliférative et expriment des marqueurs tels que S100 β contrairement aux cellules de type B. De la même manière, les cellules de type B expriment des marqueurs de cellules souches tels que la nestine ou Sox2 (Doetsch et al., 1997 ; Baer et al., 2007) qui ne sont pas exprimés par les astrocytes du parenchyme adulte.

Les cellules de type B dérivent des cellules de la glie radiaire présentes pendant le développement (Merkle et al., 2004).

Nous pouvons les sous-diviser en deux types : les cellules B1, souvent proches des cellules épendymaires, et les cellules B2, à l'interface avec le parenchyme striatal. On retrouve également des cellules de type B dans le RMS (Doetsch et al., 1997). Par ailleurs, les contacts émis par les cellules B1 vers les vaisseaux sanguins et les ventricules leur permettent de répondre à des signaux présents dans la circulation et le liquide cérébro-spinal (Mirzadeh et al., 2008).

Les cellules de type C ou précurseurs d'amplification transitoire (transit amplifying cells) sont issues de la division des cellules de type B et sont les précurseurs des neuroblastes (cellules de type A) auprès desquelles elles s'organisent souvent en amas. Au sein de la SVZ, elles présentent la plus forte activité de prolifération. Elles ne sont présentes qu'au sein de la SVZ mais sont absentes du RMS (Doetsch et al., 1997). Elles ne présentent pas les caractéristiques de cellules gliales et n'expriment pas non plus la PSA-NCAM ; elles peuvent donner naissance à des neurones ou des cellules gliales (Doetsch et al., 1997).

Les cellules de type A ou neuroblastes migrent en direction du bulbe olfactif et sont organisées en chaines parallèles aux bords des ventricules dans la SVZ et le long du RMS. Ces chaines de cellules de type A sont accompagnées d'astrocytes dans le RMS ; dans la SVZ, elles sont isolées des cellules de type E et du striatum par une gaine formée par les cellules de type B1 et B2 respectivement. Elles ont un corps

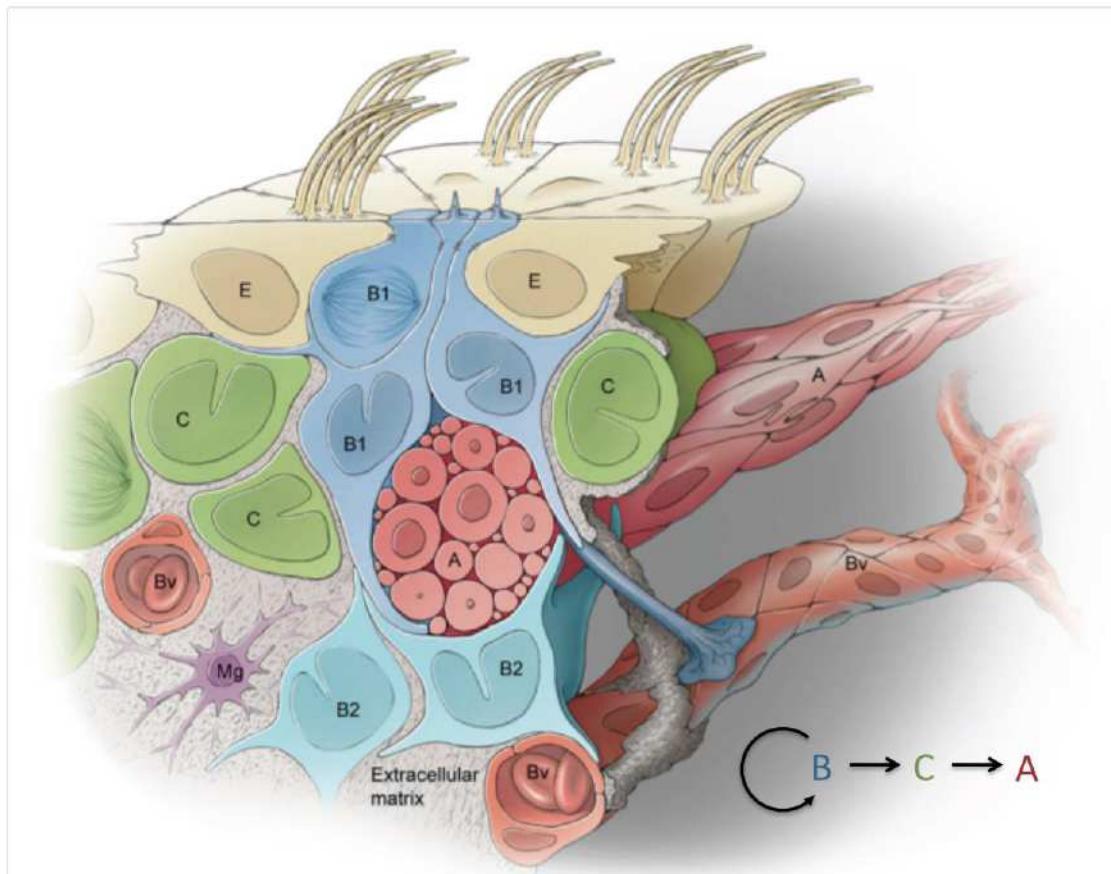


Figure 13 : Cytoarchitecture de la SVZ. Les cellules épendymaires ciliées forment une monocouche en contact avec les ventricules latéraux. Les cellules de type B sont les cellules souches de la SVZ. Les cellules de type B1 sont en contact avec les ventricules, et émettent souvent un prolongement vers les vaisseaux sanguins (Bv). Les cellules de type B2 sont à l'interface avec le parenchyme striatal. Les cellules de type C proviennent de la division des cellules de type B, et se différencieront en neuroblastes immatures (cellules de type A). La microglie (Mg) et les cellules endothéliales sont également présentes dans la SVZ et participent notamment à la régulation de la neurogenèse. (*D'après Ihrie et Alvarez-Buylla, 2011*).

cellulaire allongé et émettent un à deux prolongements, caractéristiques des cellules en migration, et expriment des marqueurs de neuroblastes immatures tels que la PSA-NCAM (molécule d'adhésion cellulaire polysialylée), la DCX (doublecortine) ; elles expriment également la nestine mais n'expriment pas la GFAP. Elles sont capables d'incorporer la [³H]-thymidine et donc de se diviser, y compris pendant leur migration (Doetsch et al., 1997).

Les cellules de type E ou cellules épendymaires forment une monocouche épithéliale ciliée continue entre le ventricule et la SVZ (Doetsch et al., 1997). On distingue les cellules épendymaires multiciliées (E1) des cellules épendymaires ne présentant que deux cils (E2). Ces cils leur conféreraient un rôle de senseurs de signaux mécaniques ou biochimiques provenant du liquide céphalo-rachidien présent dans les ventricules latéraux (Mirzadeh et al., 2008).

Une controverse portant sur leur caractère « souche » s'est établie depuis une dizaine d'années et semble toucher à sa fin grâce à des résultats récents qui montrent que bien qu'elles puissent être à l'origine de neurones ou cellules gliales, elles ne remplissent pas les critères (tels que la capacité d'auto-renouvellement) nécessaires pour être définies comme des cellules souches. Elles ne participent pas à la neurogenèse secondaire en conditions physiologiques mais pourraient représenter une source alternative de cellules en conditions post-traumatiques par exemple (Carlén et al., 2009).

La microglie, population principale de cellules immunitaires du CNS, est également présente dans la SVZ et participe activement à la régulation de la neurogenèse dans cette niche (Walton et al., 2006).

3. Migration des cellules originaires de la SVZ

a) Migration tangentielle dans le RMS

Chez le rongeur, les neuroblastes immatures étroitement associées aux astrocytes migrent en chaîne le long du RMS pendant quelques jours pour atteindre le bulbe olfactif distant de plusieurs millimètres (pour revue, Whitman et Greer 2009). Même si certains neuroblastes du RMS peuvent retourner vers la SVZ, 80% d'entre eux migrent rostrolement vers le bulbe olfactif (Bolteus et Bordey, 2004).

Ce schéma coopératif de migration particulièrement efficace (autour de 70-80µm/h) repose sur un mode saltatoire où immobilité et mouvement s'alternent (Bolteus et Bordey, 2004 ; Bovetti et al., 2007).

La migration tangentielle en chaîne nécessite l'expression de PSA-NCAM. En effet, l'inactivation du gène N-CAM induit une réduction de la taille du bulbe olfactif

et des déficits fonctionnels associés à la mémorisation spatiale (Cremer et al., 1994) ; et l'acide polysialique joue un rôle important dans la formation des chaînes du RMS puisque sa déplétion induit une dispersion des cellules les constituant (Hu, 2000).

La DCX, protéine associée aux microtubules, exprimée transitoirement par les neuroblastes immatures en migration (Brown et al., 2003), est nécessaire pour la migration des cellules de la SVZ en neurosphères *in vitro* (Ocbina et al., 2006) et le maintien de leur morphologie bipolaire (Koizumi et al., 2006). De plus, leur migration est perturbée chez les souris KO pour la DCX (Koizumi et al., 2006). Cependant, *in vivo*, toutes les cellules en migration n'expriment pas DCX (Nam et al., 2007), ce qui suggère que la DCX est nécessaire pour l'organisation du RMS, sans pour autant être indispensable à la migration de chaque cellule individuellement.

Par ailleurs, des signaux de la famille des éphrines (Conover et al., 2000), des intégrines (Jacques et al., 1998) et de la voie Slit-Robo (Wu et al., 1999) notamment sont impliqués dans le contrôle de la migration des neuroblastes.

Enfin, les astrocytes présents dans le RMS moduleraient la migration des neuroblastes (Bolteus et Bordey, 2004).

b) Migration radiaire dans le bulbe olfactif

Lorsqu'ils ont atteint le bulbe olfactif, les neuroblastes se détachent des chaînes et migrent radiairement vers leur position finale dans la couche granulaire ou périglomérulaire. Même si les mécanismes de ce détachement ne sont pas clairement élucidés, il apparaît que la reline (Hack et al., 2002) et la Tenascine-R (Saghatelyan et al., 2004) y participent. La Tenascine-R joue par ailleurs un rôle direct dans l'initiation de la migration radiaire (Saghatelyan et al., 2004).

c) Rôle de la vascularisation dans la migration des neuroblastes

Les neuroblastes migrent en étroite association avec les vaisseaux sanguins qui leur serviraient de support physique et moléculaire, aussi bien dans le RMS (Snappy et al., 2009 ; Whitman et al., 2009) que dans le bulbe olfactif (Bovetti et al., 2007). L'interaction entre les cellules endothéliales et les neuroblastes peut être directe ou faire intervenir les astrocytes (Bovetti et al., 2007 ; Whitman et al., 2009).

4. Particularités de la neurogenèse secondaire humaine

a) *Organisation de la SVZ humaine*

Une SVZ semblable à celle décrite chez les autres espèces est présente chez l'humain (Bernier et al., 2000). Il existe néanmoins quelques différences en termes de composition et d'organisation cellulaire. En effet, le ratio des types cellulaires A : B : C est de 1 : 3 : 1 dans la SVZ humaine alors qu'il est de 3 : 2 : 1 chez la souris (Curtis et al., 2005). Par ailleurs, la SVZ humaine présente pendant les premiers mois, à proximité des astrocytes, un dense réseau de neuroblastes immatures qui laisse place par la suite à une structure formée d'un ruban astrocytaire et d'une couche hypocellulaire (Quiñones-Hinojosa et al., 2006 ; Sanai et al., 2011) (Figure 14).

b) *Neurogenèse bulbaire chez l'humain ?*

Les questions de la persistance en conditions physiologiques de la neurogenèse post-développementale et de la présence du RMS chez l'humain sont jusqu'à présent sujettes à controverses (Macklis, 2012).

De récents travaux du groupe d'Arturo Alvarez-Buylla présentent des différences quantitatives et qualitatives entre les systèmes SVZ-RMS-BO des rongeurs et de l'humain. En effet, il démontre que la neurogenèse y décline chez l'humain pendant l'enfance et est presque inexistante chez l'adulte (Sanai et al., 2004 ; Sanai et al., 2011). Ceci est en accord avec une étude récente qui rapporte que la neurogenèse avec survie à long terme des neurones générés est un phénomène extrêmement limité chez l'adulte (Bergmann et al., 2012). Par ailleurs, s'ils ne contestent pas la présence du RMS chez le jeune enfant, ils émettent des doutes quant à la persistance d'une migration en chaîne massive chez l'adulte ; les neuroblastes migreraient plutôt individuellement (Sanai et al., 2004 ; Sanai et al., 2011). Par ailleurs, chez l'humain, une seconde voie de migration tangentielle a été décrite en direction du cortex préfrontal (Sanai et al., 2011).

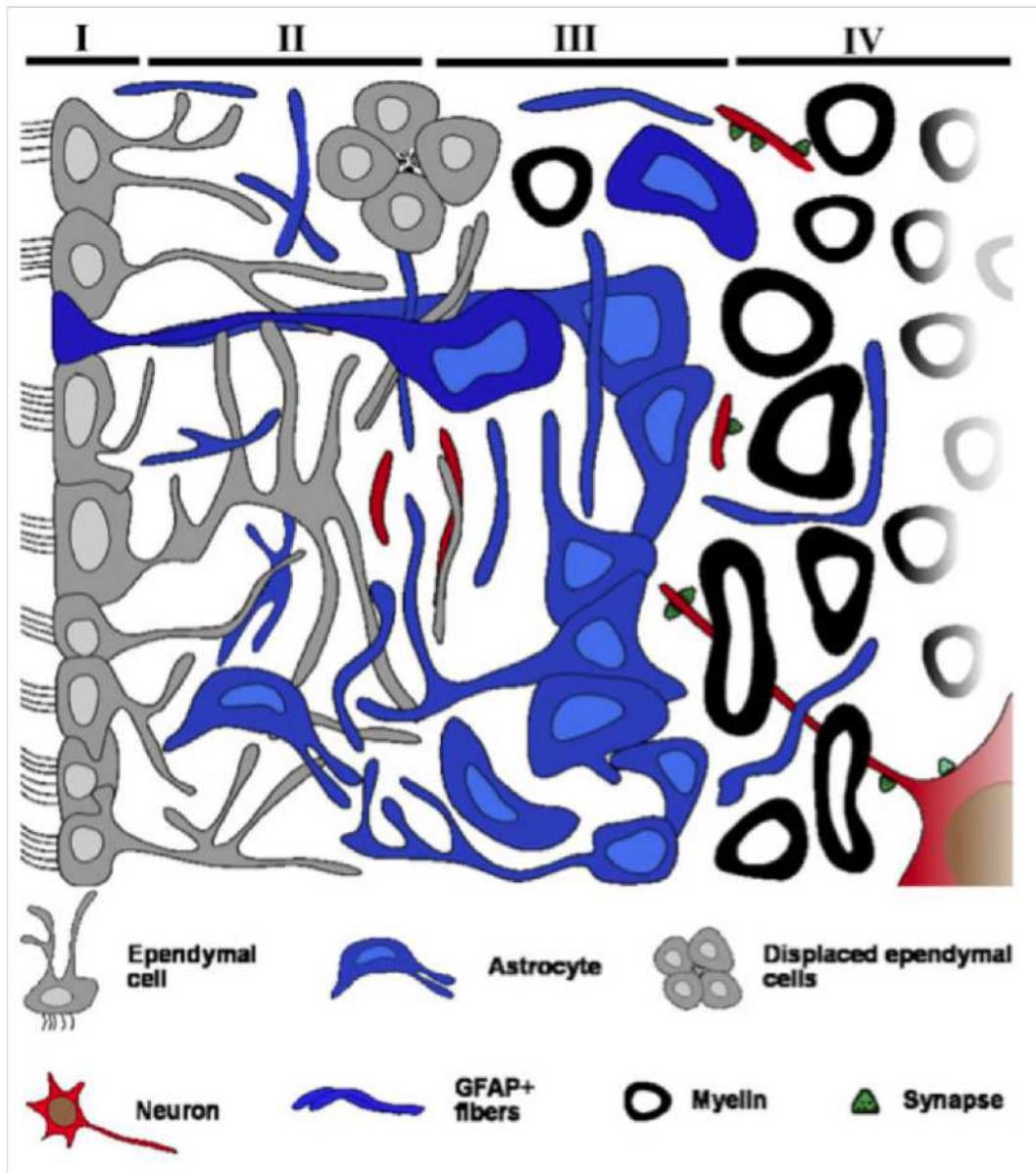


Figure 14 : Organisation de la SVZ humaine dans le plan coronal. La couche I aux bords des ventricules latéraux contient les cellules épendymaires. La couche II, hypocellulaire, précède la couche III formée d'astrocytes qui émettent des prolongements vers le ventricule latéral. La couche IV est à la transition avec le parenchyme cérébral. Des neurones sont présents, notamment à l'interface entre les couches III et IV. (D'après Quiñones-Hinojosa et al., 2006).

Enfin, le groupe d'Arturo Alvarez-Buylla conteste (Sanai et al., 2007) des travaux du groupe de Curtis qui concluent que bien que son anatomie soit altérée du fait de l'expansion plus importante du cerveau humain, un RMS fonctionnel semblable à celui des autres espèces est présent chez l'humain adulte (Curtis et al., 2007 ; Kam et al., 2009). De la même manière, d'autres auteurs concluent que de

nouveaux neurones générés dans le système SVZ-RMS-BO peuplent continuellement le bulbe olfactif adulte via le RMS (Bedard et al., 2004 ; Wang et al., 2011).

En conclusion, il semblerait que le terme « flux » ne soit pas approprié pour décrire la migration des neuroblastes chez l'humain adulte, et les termes « extension rostrale de la SVZ » ou « ruban astrocytaire » semblent préférables.

Du fait de ces potentielles variations inter-espèces, il apparaît alors que la transposition des résultats des modèles animaux à l'humain doit être considérée avec prudence.

5. Régulation de la neurogenèse

De nombreux facteurs intrinsèques (exprimés par les cellules de la SVZ), extrinsèques (produits par les tissus environnants), et environnementaux régulent la neurogenèse chez l'adulte. Nous ne les citerons pas tous ici, mais nous verrons qu'ils peuvent influer sur les différentes composantes du processus neurogénique, à savoir le maintien de la niche, la prolifération, la différenciation, la migration, la survie et la maturation des cellules de la SVZ (Figure 15).

a) Facteurs intrinsèques

De nombreux morphogènes régulent la neurogenèse, dont les membres des familles Notch, Shh, Wnts et BMPs.

La voie Notch participe au maintien des cellules souches en favorisant leur autorenouvellement et en réprimant l'engagement des cellules vers une différenciation neuronale ou gliale (Hitoshi et al., 2004).

Shh est nécessaire au maintien des progéniteurs chez l'adulte, et la stimulation de la voie Shh augmente leur prolifération (Machold et al., 2003).

Les BMP et leurs récepteurs sont exprimés par les cellules de la SVZ. Elles ont une action négative sur la neurogenèse en favorisant la gliogenèse. Leur action est antagonisée par la noggine et la neurogenesine-1 qui sont exprimées par les cellules épendymaires de la SVZ (Lim et al., 2000).

Les éphrines, connues pour leur implication dans le guidage axonal, participent également à la régulation de la prolifération cellulaire de la SVZ. Les cellules de type A et C expriment l'éphrine A2, et les cellules épendymaires et certaines cellules de type B expriment le récepteur EphA7. Ce dernier induit une inversion du signal éphrine A2 et diminue ainsi la prolifération des cellules de type C. Par ailleurs, les cellules de la SVZ expriment les ligands des éphrines B, et bloquer l'interaction entre les éphrines B et leurs récepteurs induit une augmentation de la prolifération cellulaire dans la SVZ (pour revue, Genander et Frisén, 2010).

L'identité cellulaire des cellules de la SVZ s'acquière sous l'influence de facteurs de transcription. Parmi eux, Pax 6, exprimé dans la SVZ et surtout par les neuroblastes en migration, favorise la neurogenèse ; et Olig-2, exprimé par les cellules de type C de la SVZ, induit la gliogenèse (pour revue, Lledo et al., 2006).

Différents mécanismes épigénétiques, c'est à dire des modifications héritables et réversibles de l'expression génique sans altération de la séquence ADN, participent à la régulation de la neurogenèse : méthylations, modifications des histones et ARN non-codants interviennent pendant les différentes étapes du processus neurogénique (pour revue, Sun et al., 2011).

La neurogenèse est modulée par l'état inflammatoire, notamment via l'activation de la microglie et le recrutement des cellules T du système immunitaire. L'activation microgliale n'est pas par essence pro- ou anti-neurogénique, et son effet dépend du ratio de sécrétion de molécules pro- ou anti-inflammatoires (pour revue, Ekdhal et al., 2009).

La vascularisation, très présente dans la SVZ, joue un rôle fondamental dans l'homéostasie et la régulation de la niche neurogénique et y permet la diffusion de facteurs circulants comme des facteurs de croissance, des cytokines ou des éphrines (pour revue, Decimo et al., 2012).

Les cellules endothéliales libèrent des facteurs solubles qui stimulent l'auto-renouvellement des NSCs et augmentent la neurogenèse (Shen et al., 2004). Par exemple, le PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor) active la voie Notch, et

entretient le maintien des NSCs en évitant leurs divisions asymétriques (Andreux-Agulló et al., 2009).

b) Facteurs extrinsèques

Les neurotransmetteurs participent à la régulation de la neurogenèse dans la SVZ. Ainsi, le GABA, par son action sur les récepteurs GABA_A des astrocytes de la SVZ réduit la prolifération cellulaire (Liu et al., 2005). Les neuroblastes en migration expriment également ce récepteur, et les astrocytes expriment des transporteurs au GABA. Ainsi, la modulation des niveaux de GABA, notamment via la régulation de sa recapture par les astrocytes, contrôle la vitesse de migration des neuroblastes (Bolteus et Bordey, 2004).

Les cellules de la SVZ possèdent des récepteurs à la dopamine et reçoivent des afférences dopaminergiques qui stimulent leur prolifération (Coronas et al., 2004 ; Höglunger et al., 2004).

Similairement, la prolifération cellulaire des cellules de la SVZ est augmentée par la sérotonine (Brezun et Daszuta, 1999); elle est à l'inverse diminuée par l'acide nitrique (Romero-Grimaldi et al., 2008).

Enfin, des neuropeptides tels que le PACAP (Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) ont une action positive sur la prolifération cellulaire dans la SVZ (Mercer et al., 2004).

Le statut hormonal est également un acteur de la régulation de la neurogenèse chez l'adulte et contribuerait à l'acquisition de comportements adaptatifs chez l'adulte. Ainsi, par exemple, la neurogenèse augmente pendant la gestation sous l'effet de la prolactine (Shingo et al., 2003). Les hormones thyroïdiennes, essentielles pendant le développement cérébral, participent également à la régulation de la neurogenèse chez l'adulte. In vivo, l'hypothyroïdisme est en effet associé à une réduction de la prolifération et de la migration des cellules de la SVZ (Lemkine et al., 2005).

De nombreux facteurs de croissance sont connus pour augmenter la prolifération cellulaire dans la SVZ : parmi eux, le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic

factor), le FGF (Fibroblast Growth Factor), l'EGF (Epidermal Growth Factor) et le VEGF (pour revue, Lledo et al., 2006).

c) *Conditions environnementales*

Un certain nombre de neuropathologies induisant une mort neuronale étant liées au vieillissement, la question de l'évolution de la neurogenèse avec l'âge est primordiale. Nous savons que la neurogenèse diminue chez l'adulte de façon âge-dépendante. Il a été démontré qu'elle décroît de plus de 50% dans la SVZ chez les souris âgées de 24 à 26 mois par rapport aux jeunes souris adultes de 2 à 4 mois (Maslov et al., 2004) parallèlement à des modifications de l'architecture de la SVZ et de l'expression de protéines régulant la niche neurogénique (pour revue, Decimo et al., 2012). Cependant, si le nombre de NSCs est réduit, elles conservent des capacités de prolifération et de différenciation en neurones fonctionnels (Ahlenius et al., 2009 ; Stoll et al., 2011) qui permettent d'envisager de les exploiter en conditions pathologiques.

Les effets des drogues d'abus et des médicaments sur la neurogenèse ont principalement été étudiés au niveau de la SGZ. Cependant, ceux-ci exerçant un effet sur les systèmes de neurotransmission, qui eux même modulent la neurogenèse dans la SVZ, il n'est pas surprenant de voir qu'ils peuvent agir sur la neurogenèse de la SVZ. Ainsi, les traitements antidépressifs ou antipsychotiques par exemple, modulent notamment les transmissions sérotoninergique et dopaminergique respectivement et modifient alors la neurogenèse de la SVZ (pour revue, Decimo et al., 2012). Par ailleurs, la nicotine agissant sur le système cholinergique augmente la prolifération des précurseurs de la SVZ (Mudò et al., 2007) ; à l'inverse, la dépendance alcoolique agissant principalement sur le système GABAergique entraîne une suppression durable de la prolifération cellulaire dans la SVZ (Hansson et al., 2010).

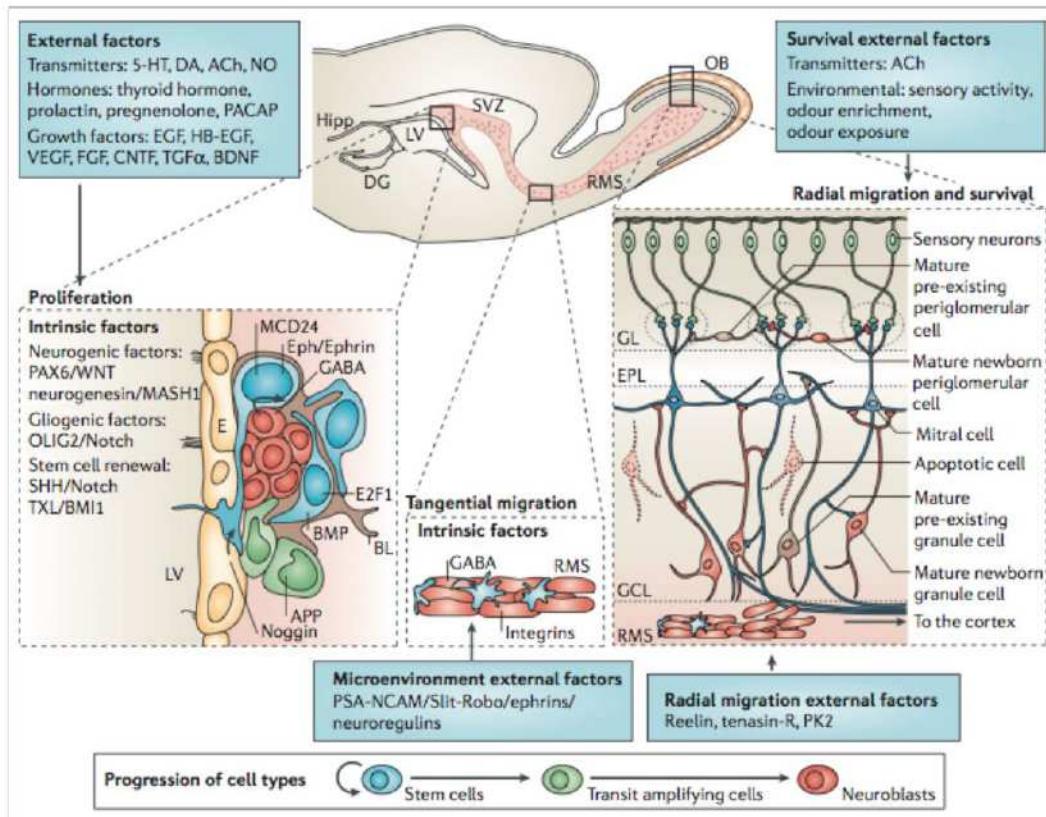


Figure 15 : Régulation de la neurogenèse dans la SVZ. Des programmes intrinsèques aux cellules de la SVZ et des facteurs extrinsèques contrôlent leur prolifération, leur migration, ainsi que leur survie et leur intégration dans les circuits neuronaux préexistants du bulbe olfactif. (*D'après Lledo et al., 2006*).

L'exposition à un stress réduit le nombre de NSCs dans la SVZ (Hitoshi et al., 2007).

L'effet positif de l'environnement enrichi sur la neurogenèse dans le gyrus denté est très documenté ; dans la SVZ, il semblerait également bénéfique après lésion ischémique (Komitova et al., 2005).

Si l'exercice physique augmente également la neurogenèse dans le gyrus denté, son rôle sur la neurogenèse de la SVZ est moins clair. L'exercice physique volontaire pendant la première semaine post-ischémique serait délétère (Komitova et al., 2005) tandis qu'il pourrait à long terme favoriser la prolifération, la migration et la survie des cellules de la SVZ (Jin et al., 2010).

d) Conditions pathologiques

En réponse à des conditions pathologiques, la neurogenèse augmente dans les niches neurogéniques d'où les cellules peuvent migrer vers les régions lésées et s'intégrer aux réseaux existants. Il semblerait également que des conditions pathologiques puissent activer des cellules souches quiescentes présentes dans des régions cérébrales non neurogéniques en conditions physiologiques telles que le cortex (pour revue, Lledo et al., 2006).

Cependant, ces mécanismes ne suffisent pas à remplacer les neurones détruits, et des effets adverses tels que la surexpression du facteur de transcription Olig2 qui réprime la neurogenèse, surviennent également après lésion (Buffo et al., 2006).

De nombreuses études se sont alors intéressées aux différentes stratégies envisageables pour promouvoir la réparation cérébrale à partir des cellules souches endogènes : exploiter et potentialiser la neurogenèse de la SVZ, et contrebalancer les mécanismes moléculaires interférant avec elle.

Ainsi, dans la suite de ce chapitre, en nous focalisant sur les résultats obtenus dans le cas de lésions corticales, nous décrirons les modifications prenant place dans la SVZ en conditions post-lésionnelles, les mécanismes induisant leur migration vers la région lésée, leur survie et leur intégration dans les circuits neuronaux pré-existants.

C. Mobilisation des cellules souches endogènes de la SVZ en conditions pathologiques

1. Prolifération cellulaire et neurogenèse après lésion corticale

Il est globalement admis qu'une lésion au niveau du cortex cérébral, à distance de la SVZ, induit une augmentation de la prolifération cellulaire dans la SVZ (pour revue, Saha et al., 2012). En effet, en utilisant la BrdU comme marqueur de la

prolifération cellulaire dans la SVZ, il a été démontré que la prolifération cellulaire y augmentait dans différents modèles de lésion corticale : après lésion traumatique (Chirumamilla et al., 2002 ; Ramaswamy et al., 2005), après lésions ischémiques importantes (Zhang et al., 2001) ou plus modérées et restreintes au cortex (Gotts et Chasselet, 2005a ; Wang et al., 2007a), et après lésion par aspiration chez le rat (Szele et Chasselet, 1996).

L'accroissement de l'épaisseur de la SVZ conséquente à l'augmentation de la prolifération cellulaire apparaît rapidement après la lésion (Ramaswamy et al., 2005) avec un pic à une semaine (Zhang et al., 2001). De plus, ce phénomène est durable, puisqu'il a été observé qu'un an après la lésion, le nombre de cellules ayant proliféré est trois à six fois supérieur selon le marqueur de prolifération utilisé (Chen et al., 2003).

Dans le cas de lésions corticales unilatérales, plusieurs études n'ont décrit ce phénomène que dans la SVZ ipsilatérale à la lésion (Zhang et al., 2001 ; Ramaswamy et al., 2005). A l'inverse, Chen rapporte également une augmentation de la prolifération cellulaire dans la SVZ controlatérale à la lésion (Chen et al., 2003). Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que ces études n'ont pas analysé le phénomène sur la même durée, or il est plus tardif dans la SVZ controlatérale à la lésion. Par ailleurs, il semblerait confiné à la partie dorsale de la SVZ (Ramaswamy et al., 2005).

Cependant, des résultats contradictoires ont été rapportés. Ainsi, Goings rapporte une diminution de la prolifération des cellules de la SVZ après lésion corticale par aspiration chez la souris (Goings et al., 2002). De la même manière, après des lésions excitotoxiques corticale ou striatale, Deierborg ne met en évidence l'augmentation de la prolifération cellulaire dans la SVZ que lorsque la lésion est proche (striatale) (Deierborg et al., 2009). Les auteurs expliquent leurs résultats respectivement par des différences inter-espèces, et par le fait que les facteurs délivrés après la lésion par le cortex, trop distant de la SVZ, ne pourraient pas induire de modification de la prolifération des cellules de la SVZ. Cependant, et particulièrement pour l'étude de Deierborg, le modèle de lésion corticale utilisé, et son étendue peu importante, pourraient expliquer les résultats obtenus.

Parallèlement, il a été décrit une augmentation différée (25 jours) du nombre de neuroblastes immatures, exprimant des marqueurs tels que DCX ou PSA-NCAM, dans la SVZ (Szele et Chasselet, 1996 ; Goings et al., 2002). Du reste, dans une étude postérieure du même groupe, où la neurogenèse dans la SVZ n'a étonnement été évaluée que sur 10 jours, il n'a pas été montré d'augmentation à court terme du nombre de cellules PSA-NCAM positives dans la SVZ (Sundohlm-Peters et al., 2005).

2. Migration des neuroblastes vers le site de lésion

Le remplacement des cellules du cortex lésé par les cellules souches endogènes suppose leur migration vers le site de lésion.

Cette question a été plus largement étudiée dans des modèles ischémiques notamment, et les données disponibles après lésion restreinte au cortex sont plus rares. Après lésion corticale par aspiration, des cellules BrdU⁺/DCX⁺ sont retrouvées dans le corps calleux (Sundohlm-Peters et al., 2005). Similairement, dans un modèle de lésion corticale par thermocoagulation, il a été observé après la lésion des cellules BrdU positives dans le striatum, le corps calleux, et autour du site de lésion (Gotts et Chasselet, 2005b). Cependant, ces études n'apportent pas de preuve de concept que ces cellules ont migré depuis la SVZ, puisque nous savons qu'en conditions pathologiques des cellules souches quiescentes, présentes dans des régions non-neurogéniques en conditions physiologiques, peuvent être réactivées (pour revue, Gould, 2007). Pour essayer de répondre à cette question, la migration des cellules de la SVZ a été étudiée après marquage de cellules de la SVZ par injection d'un rétrovirus (Goings et al., 2004) ou de microsphères fluorescentes (Ramaswamy et al., 2005). Ces études ont montré que les cellules ainsi marquées migraient en direction du striatum, du corps calleux et à longue distance vers le site de lésion.

Il semblerait que cinq jours après la lésion, la migration des neuroblastes vers le bulbe olfactif ne soit pas affectée (Sundohlm-Peters et al., 2005). A l'inverse, une autre étude du même groupe a décrit précédemment que quatre jours après la lésion, le nombre de neuroblastes migrant vers le bulbe olfactif est réduit, alors qu'il

augmente trois semaines après la lésion, suggérant que les neuroblastes sont transitoirement réorientés vers le site de lésion (Goings et al., 2004).

3. Survie et différenciation des cellules originaire de la SVZ

Dans un modèle de lésion ischémique par MCAO, il a été démontré que des neuroblastes immatures de la SVZ étaient recrutés et migraient vers le striatum lésé où ils se différencient en neurones matures de phénotype approprié. Cependant, les auteurs ont estimé qu'environ 80% des nouveaux neurones formés mourraient après deux à six semaines ; et seulement 0,2% des neurones striataux lésés ont été remplacés (Arvidsson et al., 2002). Le recrutement des neuroblastes de la SVZ dans ce même modèle de lésion a également été décrit au niveau du cortex, où ils se différencient en neurones matures et survivent après 35 jours (Kreuzberg et al., 2010).

A l'inverse, dans un modèle de lésion corticale traumatique, le phénotype des cellules de la SVZ ayant migré vers le site de lésion a été étudié. Ces cellules expriment la nestine et la GFAP, mais seulement rarement des marqueurs de neurones matures tels que NeuN (Salman et al., 2004). De la même manière, il a été décrit que seules les cellules gliales, et pas les neuroblastes, migraient vers le cortex lésé par aspiration (Sundohlm-Peters et al., 2005).

Aussi, alors qu'en conditions physiologiques, les cellules de la SVZ génèrent presque exclusivement des neurones destinés au bulbe olfactif, une partie des cellules migrant vers le site de lésion seraient re-spécifiées en cellules gliales et participeraient à la réaction gliale post-lésionnelle (Goings et al., 2004 ; Gotts et Chesselet, 2005a).

4. Facteurs impliqués dans le recrutement des neuroblastes de la SVZ en conditions pathologiques

a) Facteurs moléculaires

Il apparaît qu'un certain nombre de facteurs régulant la neurogenèse en conditions physiologiques sont également impliqués lors de la réaction de la SVZ à une lésion. Par exemple, des facteurs de croissance comme FGF-2 ou le VEGF participent à l'induction de la prolifération et de la migration vers le cortex lésé des cellules de la SVZ (Agasse et al., 2007 ; Wang et al., 2007b) ; et des voies de signalisation telles que celle de Notch (Givogri et al., 2009) et Shh (Amankulor et al., 2009) sont activées en réponse à la lésion corticale. De la même manière, après lésion, la reeline est surexprimée, et favorise le détachement des neuroblastes du RMS et leur migration ectopique vers le site de lésion (Courtès et al., 2011).

Par ailleurs, d'autres systèmes régulant la neurogenèse et la migration des neuroblastes ont été décrits, principalement dans un contexte post-lésionnel. En effet, la lésion crée une réaction inflammatoire qui induit la sécrétion de cytokines dont les neuroblastes expriment les récepteurs, permettant ainsi leur recrutement. Ces molécules peuvent être catégorisées en deux groupes : chemoattractantes ou chémorépulsives. Parmi les molécules chemoattractantes, SDF-1 (stromal derived factor 1) est sécrétée par les astrocytes réactifs dont les neuroblastes expriment le récepteur CXCR4 (pour revue, Young et al., 2011). In vitro, la surexpression de SDF1 α potentialise la migration des neuroblastes de la SVZ, tandis que la répression de l'expression de CXCR4 produit l'effet inverse (Robin et al., 2006 ; Liu et al., 2008). La voie chémorépulsive Slit-Robo joue un rôle majeur dans la migration dirigée des neuroblastes hors de la SVZ. En effet, Slit est exprimée dans la SVZ, et y constitue un signal répulsif pour les neuroblastes qui expriment les récepteurs Robo-2 et Robo-3 (Wu et al., 1999). Après lésion corticale cryogénique, il a été démontré une augmentation des niveaux d'expression des ARNm des protéines de la famille Slit, notamment Slit2 ; cependant le rôle de ces modifications d'expression n'a pas encore été clairement établi (Hagino et al., 2003).

b) Rôle de la vascularisation

Nous savons qu'en conditions physiologiques, une relation étroite existe entre la vascularisation et la neurogenèse dans les niches neurogéniques. Dans un modèle d'ischémie corticale par thermocoagulation, il a été décrit une corrélation temporelle entre l'augmentation de la prolifération cellulaire dans la SVZ et les modifications post-lésionnelles de la vascularisation qui y prennent place. En effet, la lésion y induit une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales, de l'angiogenèse et de la perméabilité vasculaire consécutives à une augmentation des niveaux d'expression du VEGF (Gotts et Chesselet, 2005b).

Par ailleurs, après lésion ischémique corticale, la sur-régulation par les cellules endothéliales de facteurs tels que SDF-1 et Ang1 (angiopoietin 1) dont les neuroblastes expriment les récepteurs CXCR4 et Tie2 respectivement favorise le recrutement des neuroblastes vers le site de lésion (Ohab et al., 2006). A contrario, réduire l'expression du récepteur à l'Epo (Erythropoietin), cytokine impliquée dans le processus d'hématopoïèse, réduit la prolifération dans la SVZ et perturbe la migration continue des neuroblastes vers le cortex en réponse à la lésion (Tsai et al., 2006).

Enfin, conformément à ce qui a été décrit en conditions physiologiques, il a été démontré, après ischémie, que les neuroblastes migrent vers le site de lésion cortical en association étroite avec les vaisseaux sanguins (Ohab et al., 2006).

5. *Relevance fonctionnelle de la mobilisation des cellules souches endogènes*

Afin d'étudier le rôle des cellules souches endogènes recrutées en conditions post-lésionnelles dans différents modèles, l'une des approches utilisées est la suppression des précurseurs neuronaux de la SVZ par différentes techniques (irradiation aux rayons X, administration de drogues antimitotiques, souris transgéniques conditionnelles). Cette ablation entraîne à *minima* une diminution du recrutement cellulaire, voire une exacerbation de la lésion ischémique (Arvidsson et al., 2002 ; Jin et al., 2010). Aussi, dans un modèle de lésion ischémique, il a été démontré que la suppression conditionnelle des cellules DCX positives dans une

lignée de souris transgéniques augmentait à court terme la taille de la lésion, et aggravait les déficits fonctionnels moteurs et sensorimoteurs associés à la lésion (Jin et al., 2010).

Une autre approche pour évaluer l'implication fonctionnelle des neuroblastes recrutés après lésion est d'augmenter ce phénomène. Ainsi, l'administration de SDF1 β et d'angiopoïétine qui favorisent la neurogenèse protège, pendant les 10 jours suivant la lésion ischémique corticale, de la perte des fonctions sensorimotrices consécutive à la lésion (Ohab et al., 2006).

Ainsi, ces résultats suggèrent que les neuroblastes de la SVZ participent à la récupération fonctionnelle post-lésionnelle et représentent une cible thérapeutique potentielle. Cependant, les mécanismes sous tendant cette amélioration ne sont pas précisément connus et, à court terme (quelques jours), il s'agirait vraisemblablement plutôt de mécanismes faisant intervenir la libération de facteurs trophiques. En effet, le remplacement cellulaire (qui impliquerait la naissance, la migration, la différenciation et l'intégration fonctionnelle des nouveaux neurones) permettrait une récupération plus tardive (quelques semaines) que celle mise en évidence dans ces études.

En conclusion, la mobilisation des cellules souches endogènes pourrait potentiellement être utile à des fins thérapeutiques, mais un certain nombre de questions restent encore en suspens. D'une part, les résultats décrits dans les différentes études ne sont pas harmonisés, vraisemblablement car les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les différents modèles peuvent varier. D'autre part, le développement de neurones matures fonctionnels et leur capacité à remplacer les circuits lésés est encore hypothétique.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Résumé de l'article 1 (en préparation)

Développement et maturation dans le temps des neurones embryonnaires corticaux et de leurs projections axonales après transplantation dans le cortex moteur lésé adulte

Isabelle Frappé¹, Sophie Péron¹, Mohamed Jaber¹, Afsaneh Gaillard¹

1. Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques, INSERM U 1084,
Université de Poitiers, France

Le cortex moteur est une structure cérébrale hautement organisée contenant de nombreux sous-types neuronaux ayant des phénotypes, des profils d'expression génique, des profils de projection et des fonctions spécifiques. La majorité des neurones corticaux sont des neurones glutamatergiques à projection qui projettent vers les cibles corticales et sous corticales du cortex moteur. Les 20% restants sont des interneurones GABAergiques qui sont principalement impliqués dans la régulation des circuits locaux (Hendry et al., 1987 ; Meinecke and Peters, 1987). Pendant le développement embryonnaire, le cortex moteur est généré à partir des progéniteurs corticaux du télencéphale selon une séquence temporelle précise : les neurones des couches profondes sont générés en premier, avant les neurones des couches superficielles. L'expression spécifique de gènes par les neurones à projection des différentes couches corticales permet leur identification. Par exemple, Ctip2 est utilisé comme marqueur des neurones à projection des couches profondes V et VI, tandis que Cux1 est spécifique des neurones à projection des couches superficielles (pour revue, Leone et al., 2008).

En réponse à une lésion corticale, les capacités de repousse axonale et de régénération spontannée du système nerveux central sont limitées. La transplantation neuronale apparaît alors comme une stratégie thérapeutique prometteuse afin de remplacer les neurones et les voies lésés. Il a été démontré que la transplantation de neurones embryonnaires corticaux dans le cortex moteur lésé

adulte permet la reconstruction anatomique des voies motrices lésées, les neurones embryonnaires transplantés développant des projections axonales vers les cibles corticales appropriées, y compris à longue distance vers la moelle épinière (Gaillard et al., 2007). Il a été démontré par des expériences de transplantation homotopique (par exemple, la transplantation de neurones embryonnaires du cortex moteur dans le cortex moteur lésé) et hétérotopique (par exemple, la transplantation de neurones embryonnaires du cortex visuel dans le cortex moteur lésé) que l'efficacité des transplants à reconstruire les voies lésées dépend de la région d'origine des neurones transplantés puisque seuls les transplants d'origine motrice permettent de rétablir les voies motrices lésées (Gaillard et al., 2007). Il a aussi été démontré dans des modèles de la maladie de Parkinson que, parmi les neurones dopaminergiques embryonnaires du mésencéphale ventral transplantés, seuls les neurones A9 nigraux établissent des connexions avec le striatum de l'hôte (Thompson et al., 2009). La région d'origine et le sous-type neuronal transplanté apparaissent alors comme des éléments déterminants au regard de la capacité des neurones transplantés à reconstruire les voies lésées.

L'étude morphologique des neurones corticaux embryonnaires transplantés après lésion ischémique corticale montre que les transplants contiennent des neurones pyramidaux, des neurones non-pyramidaux et des cellules gliales (Belichenko et al., 2001). De plus, par marquages immunohistochimiques et en électrophysiologie (en patch clamp), il a été démontré que le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur dans les transplants de neurones corticaux embryonnaires implantés dans le cortex moteur lésé par aspiration, et des récepteurs GABAergiques, glutamatergiques et cholinergiques sont présents dans les transplants embryonnaires ainsi que des neurones GABAergiques (Santos-Torres et al., 2009). Cependant, il a été rapporté dans les transplants de neurones corticaux embryonnaires transplantés dans le cortex somatosensoriel une réduction relative de la proportion de neurones GABAergiques par rapport au cortex sain (Bragin et al., 1991). De plus, l'organisation laminaire des transplants de neurones corticaux embryonnaires placés dans le cortex lésé serait altérée : les neurones corticaux embryonnaires s'organiseraient plutôt en amas séparés par des faisceaux de fibres

(Castro et al., 1985 ; Plumet et al., 1990 ; Garnier et al., 1995 ; Pinaudeau et al., 2000 ; Gaillard et Roger, 2000 ; Santos-Torres et al., 2009).

L'objectif de notre travail a été d'étudier la maturation et le développement des neurones embryonnaires corticaux transplantés dans le cortex moteur lésé adulte, et d'analyser dans le temps, le développement de leurs projections axonales.

Pour cela, nous avons transplanté dans le cortex moteur lésé par aspiration de souris adultes des fragments de tissu embryonnaire cortical moteur prélevés à E14 chez des souris surexprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de l'actine- β . Afin d'examiner le développement des cellules greffées, les souris transplantées ont été sacrifiées à différents temps post-transplantation : à 2 jours, 4 jours, 7 jours, 14 jours et 30 jours. Les cerveaux ont été prélevés puis des immunomarquages ont été réalisés sur les coupes de cerveau. Un immunomarquage contre la GFP a permis de marquer les cellules transplantées et leurs prolongements axonaux. Afin de marquer les neuroblastes immatures présents dans les transplants, des immunomarquages contre la doublecortine (DCX, protéine associée aux microtubules présente dans les corps cellulaires et prolongements des neurones immatures) et la PSA-NCAM (forme polysialylée de la molécule d'adhésion cellulaire neurale, exprimée par les progéniteurs neuraux) ont été réalisés. Les astrocytes ont été marqués par immunomarquage contre la GFAP. Les neurones matures ont été marqués par immunomarquage contre NeuN, et leur phénotype glutamatergique ou GABAergique a été évalué par immunomarquages contre le V-GLUT1 (transporteur vésiculaire du glutamate 1) et le GABA respectivement. Enfin, les immunomarquages contre les facteurs de transcription Ctip2 et Cux1 ont permis de marquer respectivement les neurones à projection des couches profondes et des couches superficielles.

L'étude de la croissance des transplants et du développement de leurs projections axonales GFP $^+$ montre que à 2 jours post-transplantation, les cellules transplantées forment une fine couche dans la cavité lésionnelle au contact du cortex moteur de l'hôte (volume moyen \pm erreur standard: $0,07 \pm 0,02 \text{ mm}^3$). Dans certains cas, quelques projections axonales GFP $^+$ sont présentes dans le cortex adjacent de l'hôte. A 4 jours post-transplantation, le volume des transplants a presque triplé par rapport à 2 jours post-transplantation (volume moyen \pm erreur

standard: $0,2 \pm 0,06 \text{ mm}^3$), et la quantité de fibres présentes dans le cortex adjacent de l'hôte a augmenté. Dans certains cas, des fibres GFP⁺ sont présentes dans le corps calleux. Sept jours après la transplantation, les transplants remplissent partiellement la cavité lésionnelle (volume moyen \pm erreur standard: $0,33 \pm 0,06 \text{ mm}^3$), et de nombreuses fibres GFP⁺ sont présentes dans toutes les couches du cortex ipsilatéral. Des fibres GFP⁺ empruntent le corps calleux et atteignent le striatum dorsal ipsilatéral et le cortex contralatéral. Quatorze jours après la transplantation, les transplants remplissent la cavité lésionnelle (volume moyen \pm erreur standard: $0,63 \pm 0,08 \text{ mm}^3$), la densité des projections axonales développées par les neurones transplantés a augmenté par rapport au 7^e jour post-transplantation. Certaines fibres GFP⁺ atteignent des cibles sous-corticales distantes telles que le thalamus et la capsule interne. Trente jours après la transplantation, le volume des transplants a augmenté de 60% (volume moyen \pm erreur standard: $1 \pm 0,22 \text{ mm}^3$) par rapport au 14e jour post-transplantation, et de nombreuses fibres GFP⁺ innervent le cortex ipsilatéral et contralatéral, le striatum, le thalamus et la capsule interne. Dans certains cas, des fibres GFP⁺ sont également présentes dans les noyaux du pont.

L'étude du développement et de la maturation des cellules greffées par immunomarquages DCX, PSA-NCAM et NeuN montre que jusqu'à 4 jours post-transplantation, les transplants sont principalement composés de neuroblastes immatures (Fig. 1); aucun neurone mature NeuN⁺ n'est présent dans les transplants à ce temps. Sept jours après la transplantation, les cellules transplantées expriment encore fortement la DCX et la PSA-NCAM, et dans certains cas, quelques neurones matures NeuN⁺ sont détectés (Figs. 1 et 2). Quatorze jours après la transplantation, l'expression de DCX et de PSA-NCAM a fortement diminué dans les transplants, et de nombreux neurones matures NeuN⁺ sont présents dans tous les transplants (Figs. 1 et 2). Après 30 jours, seuls quelques rares neuroblastes exprimant la DCX ou la PSA-NCAM sont observés dans les transplants, principalement peuplés de neurones matures (Fig. 3).

La caractérisation phénotypique des neurones transplantés par immunomarquages contre le GABA et le V-GLUT1 montre qu'une majorité des neurones matures présents dans les transplants sont de type glutamatergique, et les

autres sont de type GABAergique, conformément à la composition neuronale du cortex moteur sain (Fig. 3). De plus, les facteurs de transcription des neurones à projection Cux1 et Ctip2 sont exprimés par les cellules transplantées dès le 2^e jour post-transplantation et jusqu'au 30^e jour post-transplantation (Fig. 4). Les neurones exprimant soit Cux1, soit Ctip2 semblent présenter un certain niveau d'organisation, puisque bien que les différentes couches corticales ne soient pas apparentes, ils se regroupent en amas distincts au sein du transplant (Fig. 4).

L'immunoréactivité pour la GFAP, marqueur des astrocytes, est élevée jusqu'à 7 jours post-transplantation ; elle diminue à partir de 14 jours post-transplantation et apparaît principalement à la limite hôte/transplant et entre les amas neuronaux.

Cette étude présente donc une description détaillée de la maturation, de la composition cellulaire et des projections axonales des neurones corticaux embryonnaires transplantés dans le cortex moteur lésé de la souris adulte. Elle fournit ainsi des données de références auxquelles pourront être comparés le développement après transplantation de neurones corticaux dérivés de cellules souches.

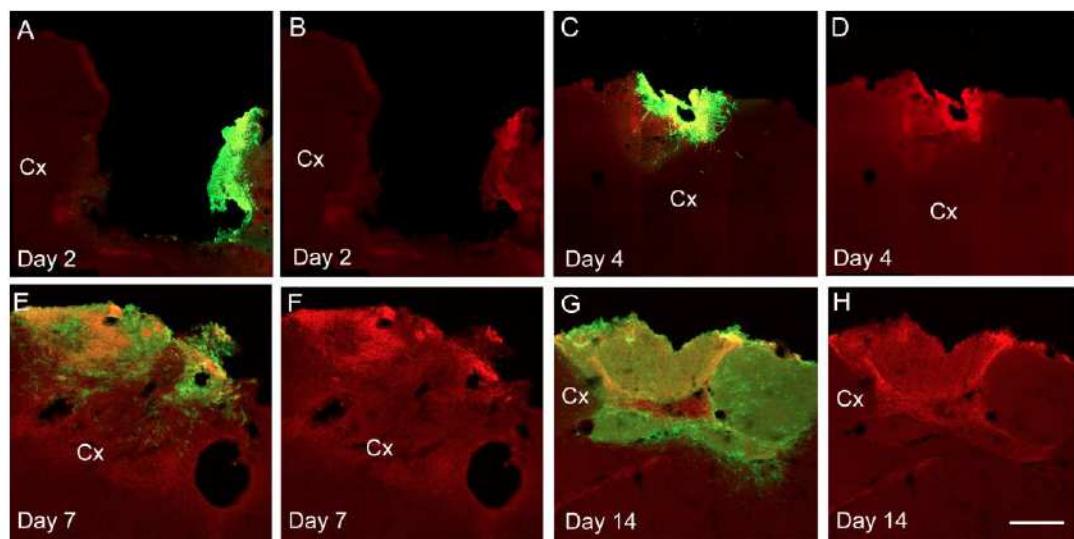


Figure 1 : (A-H) Images en microscopie confocale de l'expression de la DCX (en rouge) dans les transplants GFP+ (en vert) à différents temps post-transplantation. Les cellules transplantées expriment fortement la DCX jusqu'à 7 jours post-transplantation (A-F), puis son expression diminue à 14 jours après la transplantation (G,H). Cx : cortex. Barre d'échelle : (A-H) 200 µm.

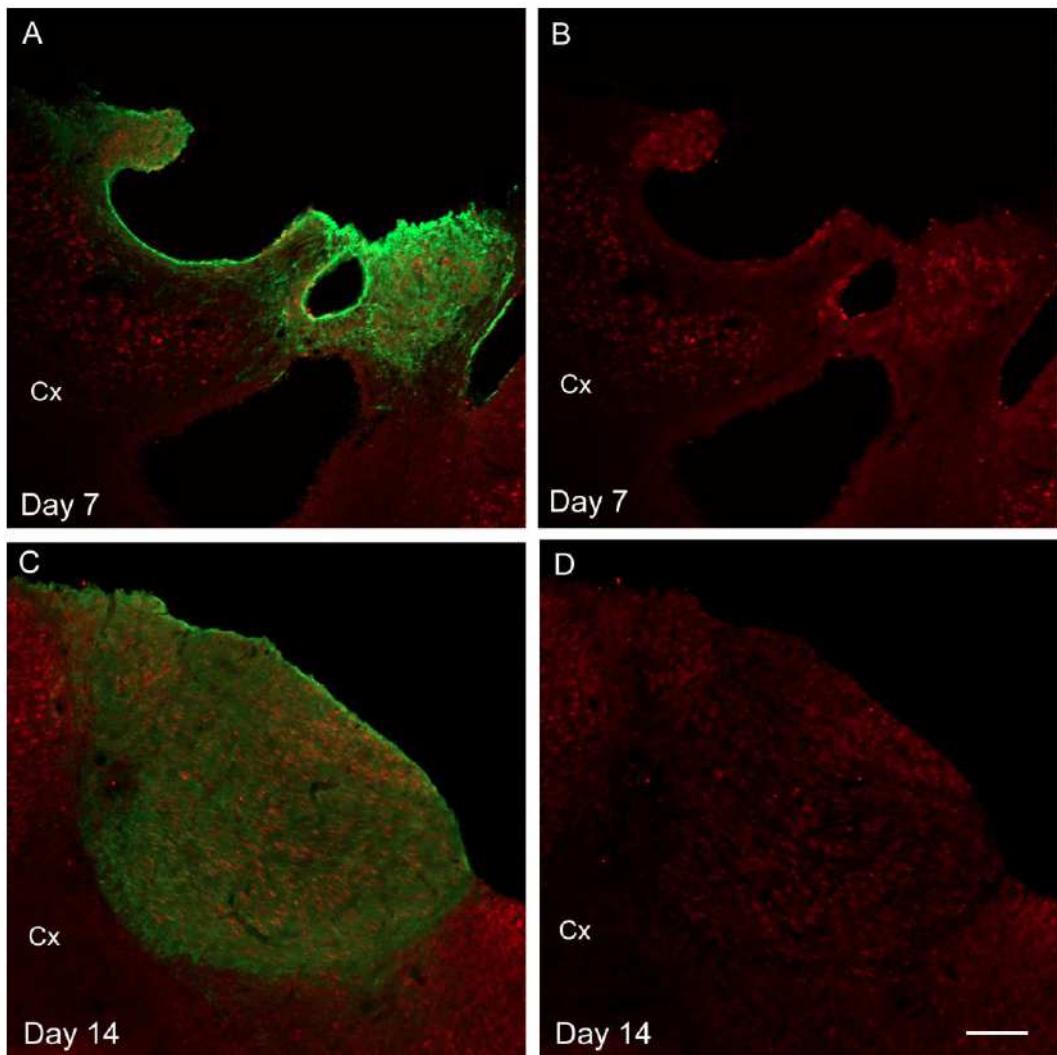


Figure 2: (A-D) Images en microscopie confocale montrant les neurones matures NeuN+ (en rouge) dans les transplants GFP+ (en vert). Sept jours après la transplantation, quelques neurones matures sont présents dans les transplants (A,B). Quatorze jours après la transplantation, les transplants contiennent de nombreux neurones matures (C,D). Cx : cortex. Barre d'échelle : (A-D) 150 µm.

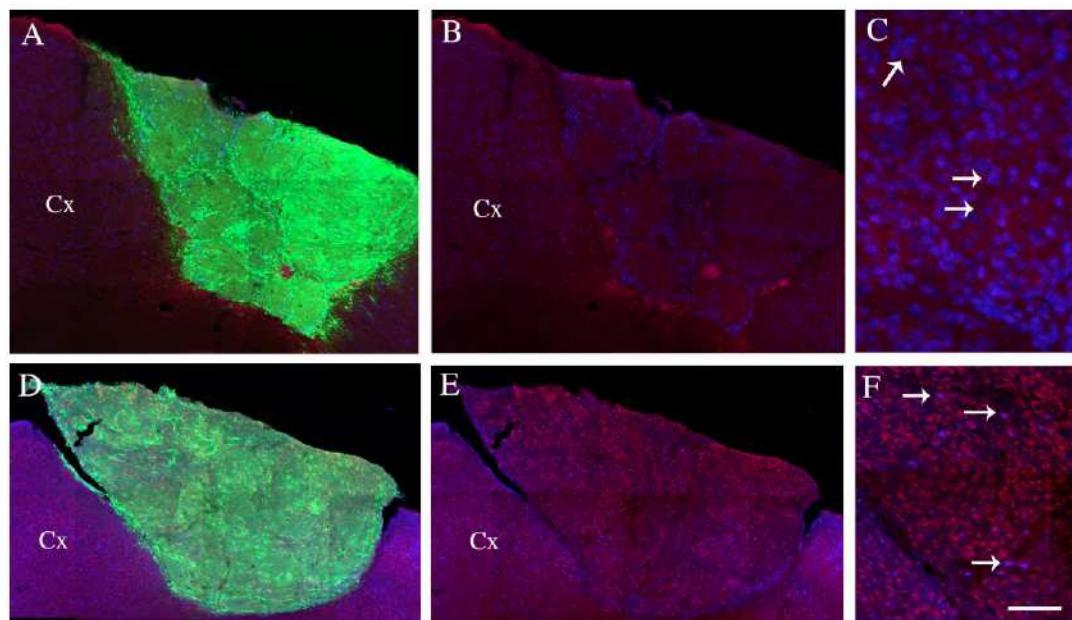


Figure 3 : Phénotype des neurones matures au sein du transplant. Images en microscopie confocale des neurones matures NeuN+ (en bleu) du transplant GFP+ (en vert) exprimant le V-GLUT1 (en rouge) trente jours après la transplantation (A-C). Images en microscopie confocale des neurones matures NeuN+ (en rouge) du transplant GFP+ (en vert) exprimant le GABA (en bleu) (D-F) trente jours après la transplantation. Une majorité des neurones du transplant sont de type glutamatergique, les autres sont de type GABAergique. Cx : cortex. Barre d'échelle : (A,B,D,E) 200 µm, (C) 50µm, (F) 80µm.

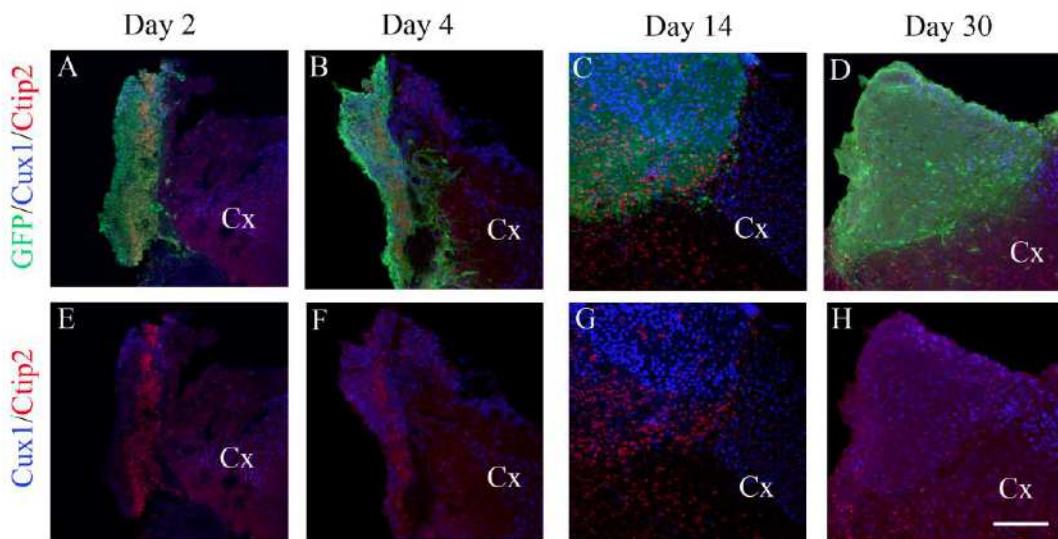


Figure 4 : (A-H) Images en microscopie confocale de l'expression des facteurs de transcription Cux1 (en bleu) et Ctip2 (en rouge) dans les transplants GFP+ (en vert) à différents temps post-transplantation. Les cellules transplantées exprimant soit Cux1 soit Ctip2 présentent un certain niveau d'organisation et se regroupent en amas ou bandes. Cx : cortex. Barre d'échelle : (A,B,E,F) 280 µm, (C,D,G,H) 140 µm.

Résumé de l'article 2 (en soumission)

Influence d'un délai entre la lésion corticale et la transplantation sur la vascularisation et le développement des cellules transplantées d'un point de vue anatomique et fonctionnel

Les lésions cérébrales, qu'elles soient d'origine traumatique ou neurodégénérative, entraînent une mort cellulaire associée à des déficits fonctionnels importants. Afin de pallier aux capacités limitées de régénération spontanée des neurones du système nerveux central adulte, les stratégies de remplacement cellulaire par transplantation de tissu embryonnaire présentent un potentiel intéressant. Il a été démontré que la transplantation de neurones corticaux embryonnaires immédiatement après la lésion du cortex moteur permet un rétablissement point à point des voies motrices lésées. En effet, les neurones transplantés émettent des projections vers les cibles appropriées du cortex moteur, y compris à longue distance vers la moelle épinière, et des contacts synaptiques réciproques s'établissent entre l'hôte et le transplant (Gaillard et al., 2007).

Différents facteurs interviennent dans le développement, la survie et l'intégration du tissu transplanté. La néoangiogenèse qui permet l'irrigation du transplant par les vaisseaux de l'hôte et l'apport en oxygène et composés métaboliques ; de même que les facteurs trophiques libérés par les cellules immunitaires et gliales en réponse à la lésion, apparaissent comme des éléments déterminants pour le devenir des transplants. Nous savons que la néoangiogenèse et la libération de facteurs trophiques sont des phénomènes post-lésionnels dynamiques et transitoires avec un pic d'intensité à une semaine (Dray et al., 2009 ; Nieto-Sampedro et al., 1983). Par ailleurs, dans des modèles de lésion ischémique ou de lésion par aspiration du cortex moteur ou entorinal, il a été suggéré qu'introduire un délai entre la lésion et la transplantation favorise la survie et la croissance des transplants (Nieto-Sampedro et al., 1983, Gibbs et Cotman, 1987 ; Gonzalez et Sharp, 1987 ; Grabowski et al., 1994).

Ainsi, l'objectif de cette étude, réalisée en collaboration avec le Dr Franck Debarbieux (Institut de Biologie du Développement de Marseille-Luminy, UMR

CNRS-Université 6216, Marseille), a été d'étudier l'influence d'un délai entre la lésion corticale et la transplantation sur la vascularisation et le développement des cellules transplantées d'un point de vue anatomique et fonctionnel.

L'étude a été réalisée dans un modèle de transplantation homotopique de tissu embryonnaire cortical moteur prélevé à E14 et surexprimant la protéine fluorescente verte (GFP) sous le contrôle du promoteur de l'actine- β . Suite à une lésion unilatérale par aspiration du cortex moteur, des souris adultes ont reçu un fragment de tissu embryonnaire cortical soit immédiatement après la lésion, soit une semaine plus tard. La vascularisation du tissu transplanté a été étudiée à différents temps *in vivo* grâce à l'imagerie par microscopie bi-photonique et post-mortem par immunomarquage. L'apoptose, la prolifération cellulaire, la croissance des cellules transplantées et les projections développées par les neurones du greffon ont également été étudiées par des marquages immuno-histochimiques réalisés après sacrifice à différents temps post-transplantation. Enfin, une étude comportementale a été réalisée à l'aide d'un test de préhension, le « staircase test », afin de tester l'influence d'un délai sur la récupération des fonctions motrices lésées.

Nos résultats montrent qu'introduire un délai entre la lésion et la transplantation augmente significativement le volume des transplants. Afin d'expliquer cette observation, nous avons testé deux hypothèses : une diminution de la mort cellulaire et/ou une augmentation de la prolifération cellulaire dans le transplant. Nous avons évalué l'apoptose des cellules transplantées par la méthode TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling). Il apparaît que l'introduction d'un délai entre la lésion et la transplantation ne modifie pas le nombre cellules apoptotiques dans les transplants. Afin d'étudier la prolifération cellulaire dans les transplants, nous avons injecté deux doses quotidiennes de 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) aux souris transplantées pendant les trois jours suivant la transplantation. La quantification des cellules post-mitotiques ayant incorporé la BrdU montre qu'introduire un délai entre la lésion et la transplantation augmente fortement la prolifération des cellules transplantées.

Par ailleurs, l'analyse de la vascularisation des transplants montre une augmentation transitoire de la densité des vaisseaux sanguins dans le cas où un délai de 7 jours est imposé entre la lésion et la transplantation. De plus, l'analyse des doubles marquages vaisseaux sanguins/GFP montre une différence dans l'origine des vaisseaux sanguins présents dans le transplant. En effet, lorsque la transplantation est réalisée immédiatement après la lésion, ceux-ci proviennent presque exclusivement de l'hôte ; tandis que lorsqu'un délai est introduit entre la lésion et la transplantation, les vaisseaux proviennent à la fois de la régénération des vaisseaux sanguins de l'hôte et du tissu transplanté.

L'introduction d'un délai entre la lésion et la transplantation n'altère pas la distribution des projections développées par les cellules transplantées. De plus, l'un des résultats marquants de cette étude est l'impressionnant accroissement du nombre de projections émises par les neurones transplantés vers toutes les cibles appropriées du cortex moteur lorsqu'un délai est introduit entre la lésion et la transplantation.

Etant donnés les bénéfices qu'entraîne l'introduction d'un délai entre la lésion et la transplantation sur le devenir des greffes d'un point de vue anatomique, nous avons émis l'hypothèse que ces conditions de transplantation permettraient également une meilleure récupération fonctionnelle des capacités motrices. Nos résultats montrent un déficit significatif des capacités motrices des souris lésées par rapport aux souris contrôles. Les souris transplantées sans délai présentent une tendance à l'amélioration non significative par rapport aux souris contrôle ; cette tendance à l'amélioration est encore plus marquée pour les souris transplantées avec délai.

Ainsi, nos résultats montrent que l'introduction d'un délai d'une semaine entre la lésion et la transplantation corticale est bénéfique d'un point de vue anatomique sur la croissance, la vascularisation, la prolifération cellulaire des transplants et le nombre de projections développées par les neurones transplantés. Si les tendances observées sur la récupération fonctionnelle après la transplantation sont confirmées, nos résultats auront une implication potentielle importante sur les conditions cliniques d'utilisation des thérapies cellulaires par transplantation.

Influence of a delay between lesion and transplantation on neo-angiogenesis, cell proliferation and survival of cortical grafted embryonic neurons

Sophie Péron¹, Franck Debarbieux², Maureen Francheteau¹, Pascal Weber², Geneviève Rougon², Mohamed Jaber¹, Afsaneh Gaillard¹

2. Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques, INSERM U 1084,

Université de Poitiers, France

3. Institut de Biologie du Développement de Marseille-Luminy, UMR CNRS-

Université 6216, Marseille, France

Abstract

Damage to the rodent adult motor cortex leads to severe and frequently irreversible deficits in motor function. One approach for overcoming the generally limited capacity of the mature central nervous system to regenerate axons in response to cell loss is the transplantation of embryonic neurons. The transplanted cells are dependent on host circulation for oxygen and metabolic compounds.

Here, we combined the use of genetically modified mice over-expressing GFP together with in vivo 2-photon microscopy for studying the temporal and spatial patterns of blood vessels and the dynamic of graft axonal outgrowth in association with blood vessels evolution. We also determined cell proliferation and apoptosis in the graft at different time points after a delayed transplantation. Finally, the impact of delayed transplantation on connectivity of the grafted neurons and impact on functional recovery was evaluated.

Our data shows that the blood supply to the cortical tissue transplanted without a delay originated primarily from the regenerated host vessels. By contrast, the microvasculature of the cortical tissue transplanted into the lesion cavity with a delay of 1 week originated both from the transplanted tissue and regenerated host vessels. In addition, a delay between lesion and transplantation enhanced graft cell proliferation, survival as well as the density of the projections developed by grafted neurons.

Taken together these results show that the rate of vascularization may be a major determinant of neuronal survival and suggest that enhancement of angiogenesis in the damaged cortical area may provide an improved environment for enhanced proliferation of transplanted cells that are involved in repair and recovery.

Introduction

Damage to the rodents adult motor cortex leads to severe deficits in motor function in the contralateral limbs and loss of coordination (Whishaw et al., 1986). One approach for overcoming the generally limited capacity of the mature central nervous system to regenerate axons in response to cell loss is the transplantation of embryonic neurons. We have previously reported that embryonic cortical neurons grafted into the adult motor cortex in an acute cortical aspiration lesion model developed projections to appropriate cortical and subcortical host targets (Gaillard et al., 2007). For neural transplants to be considered as possible therapy for human brain injury it is of relevance to explore the importance of a delay between lesion and transplantation, as it is not always possible to perform transplantation surgery immediately after injury and also as tissue for grafting may not be readily available immediately after lesion. In the present study, embryonic motor cortical tissue transplantation was performed into the forelimb motor cortex of adult mice either immediately or one week after

cortical lesion. The importance of the delay was examined by comparing the graft size, cell proliferation, survival, vascularization and connectivity of the grafted tissue as well as the impact on repair and recovery.

Methods

Animals.

Housing of the animals and all animal experimental procedures were carried out in accordance with the guidelines of the French Agriculture and Forestry Ministry (decree 87849) and the European Communities Council Directive (86/609/EEC). All efforts were made to reduce the number of animals used and their suffering.

Transplantation procedure.

Adult (3-6 month old) C57BL/6 mice (n=49, R Janvier) were used as recipients, and the transplantation procedure was carried out as described previously (Gaillard et Roger, 2000). Briefly, animals were anaesthetized with avertin (ip., 250 mg per kg of body weight) and the motor cortex was aspirated from 0.5-2.5 mm rostral to the Bregma and from 0.5-2.5 mm lateral to the midline, with the corpus callosum left intact. Motor cortical tissue was obtained from embryonic day 14 transgenic mice embryos overexpressing the enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the control of a chicken beta-actin promotor (C57BL/6-TgN(beta-act-EGFP) Osb strain (Okabe et al., 1997). Motor cortical tissue was deposited into the host lesion cavity either immediately (n=25) or 7 days (n=24) after the lesion. Care was taken to maintain the original dorso-ventral and antero-posterior orientations of the cortical fragments during the transplantation procedure. To allow better visualization of sprouting of the host vessels into the transplant, GFP transgenic mice were used as recipients (n=22) and donor motor cortical tissue was obtained from C56BL/6

foetuses. For *in vivo* two photon microscopy analysis, a round glass coverslip (diameter: 6mm) was glued with a histo-compatible acrylic glue, (Cyanolit) on the surrounding bone. Bone surface had been previously thinned to maximize glass contact with brain and grafted tissue while taking care to impose virtually no pressure. Bone was scratched and dried to improve later adherence of the glue. A drop of PBS was applied only in the centre of the window before placing the glass coverslip and glue was then generously applied. Spreading was observed around and below the glass but it was limited forward at the interface with the PBS drop due to the hydrophobicity of the glue. Once dried the tight seal of the glue was further reinforced with dental cement.

In vivo Two-photon microscopy and data analysis.

Prior each imaging session, mice were anaesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture of Xylazine/Ketamine (10mg/kg and 100mg/kg, respectively) and retroorbitally injected intravenously with 100 μ l of a RhodamineB or a Cascade Blue conjugated 70kD dextran solution (20mg/ml in Phosphate Buffer Saline, Sigma Aldrich). Care was taken to alternate each conjugate to limit the contaminating accumulation of fluorescence in macrophages (Fenrich et al. 2012). Animals were positioned on a home made stereotactic frame whose angular position could be adjusted in all directions to ensure perfect planar repositioning of the animal under a 20X water immersion objective (NA= 1.0). Anaesthesia was supplemented hourly to prevent toe pinch reflex.

We used Zeiss two-photon microscopes (LSM7MP) home-modified to fit animal below the objective and coupled to a femtosecond pulsed infrared laser (Mai-Tai, Spectra Physics) tuned at 800nm or 840nm. GFP (520-555nm) RhodamineB (605-650nm) Cascade Blue (400-480nm) signals were simultaneously collected on 3 non-descanned detectors. Detector gains were set to use all the 12bit dynamic range on

each channel while laser intensity was adjusted according to depth. Optimal intensity parameters were defined every 50 μ m for each mouse before starting tiled acquisition. These parameters were linearly interpolated for intermediate depth values. 25 fields of view were typically acquired to completely cover the glass window (roughly a 2x2 mm² area) over a depth of 500 μ m using 5 μ m steps. Mice underwent imaging sessions at 4 and 7 days post implantation and 14, 28 days post-implantation if clarity of the window permitted. Data from each channel were median filtered and analyzed separately using ImageJ software. Vascular 3D image stacks were segmented semi-automatically using Otsu method while the area occupied by the graft was identified based on a Huang thresholding paradigm. Blood supply inside the graft was expressed as the vascular voxel density inside the thresholded graft volume. Data were expressed as mean \pm SEM over the mice and significance tested using a Mann-Whitney two tail U-test with P<0.05 used as a criterion for significance. Illustrations of the figures correspond to 3D projections of the images stacks using depth cueing algorithm available in ImageJ.

Post mortem study.

55 mice were used for post-mortem study for projections developed by the transplant, angiogenesis, cellular proliferation and cellular survival in the transplant on free-floating sections.

BrdU injections. To assess cellular proliferation in the graft, mice received 2 daily injections of BrdU (Sigma) (50mg/kg, 0,1M NaOH, NaCl 0,9%, i.p.) separated by 4 hours during the 3 days following transplantation.

Tissue processing. Mice were injected with a lethal dose of avertin and perfused transcardially with 150 ml of saline (0.9%), followed by 200 ml ice-cold paraformaldehyde (PFA, 4%) in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7,4). Brains and spinal cords were removed and postfixed in 4% PFA overnight. Brains were cut into

40µm coronal section with a vibratome (Microm HM650V, Thermo Scientific) and stored in a cryoprotective solution (20% glucose, 40% ethylene glycol, 0,025% sodium azide, 0,05M phosphate buffer, pH 7,4). Spinal cords were cryoprotected in a 30% sucrose solution overnight, cut on a freezing microtome (Microm HM450, Thermo Scientific) 40µm coronal section and stored in cryoprotective solution.

Immunohistochemistry. Free-floating sections were incubated for 1 hour at RT in a blocking solution (5% Donkey serum, 0,3% triton X-100 in TBS 0,1M, pH 7,6). Primary antibodies, diluted in blocking solution, were applied for 2 hours at RT and overnight at 4°C. Appropriate secondary antibodies were diluted in blocking solution and applied for 1h at RT. The following antibodies were used in this study: rabbit anti-GFP (1:1000, Molecular probes), goat anti-DCX (1:300, Santa Cruz Biotechnologies), rat anti-CD31 (1:250, BD Biosciences) and rat anti-BrdU (1:200, Serotec). For BrdU staining, sections were pre-treated with 2N HCl, 0,5% Triton X-100 30 min at 37°C followed by incubation with Borax (pH 8,6) for 30 min at RT and blocking with 3% bovin serum albumin (Sigma), 0,3% Triton X-100 in PBS 0,1M, pH7,4. The sections were covered with DePeX (VWR) mounting media.

TUNEL procedure. To examine apoptotic cell death of grafted tissue, terminal transferase biotinylated-dUTP nick end labelling (TUNEL) was performed on free-floating sections using a protocol modified from (Bessert and Sfoff, 1999). Sections were rinsed 3 times for 10 min at RT in 0,1M PBS, pH 7,4, treated 15 min at RT with 0,3% Triton X-100 in 0,1M PBS, pH 7,4, and rinsed 3 times for 10 min in 0,1M PBS, pH 7,4. Sections were treated with 200ng/mL proteinase K (Invitrogen) in 0,1M Tris HCl, pH 8.0, 0,05M EDTA for 6 min at 37°C and washed in 0,1M glycine in 0,1M PBS, pH 7,4 for 5 min at RT. Sections were incubated in 0,25% acetic anhydride in 0,1M triethanolamine, pH 8.0 and 0,9% NaCl for 10 min at RT, rinsed for 10 min RT

in sterile dH₂O and for 5 min in 0,1M PBS, pH 7,4 at RT. Then, the sections were treated for 20 min at RT in 0,2% H₂O₂ and rinsed in PBS, pH 7,4 for 10 min at RT. Sections were incubated in TUNEL reaction mixture from the in Situ Cell Death Detection Kit TMR red (Roche) diluted 2 times in TUNEL dilution Buffer (30mM Tris/HCl, 140 mM sodium cacodylate and 1mM CoCl₂) for 1h at 37°C and washed 3 times for 10 min at RT in 0,1M PBS, pH 7,4.

Data acquisition and quantification.

For each animal, blood vessels, BrdU or TUNEL labelling within the grafts was quantified in 5 equally spaced sections.

For blood vessel quantification, images were taken with MVX 10 macroscope (Olympus) and density of CD31 labelling was determined using Mercator Pro software (Explora Nova). Results were expressed as the density of blood vessels in the graft (calculated: total surface of blood vessels/total surface of the transplant).

BrdU positive cells quantification was performed with Mercator Pro software (Explora Nova) on pictures taken with a Leica DM5500B microscope.

TUNEL positive cells were counted manually on a Zeiss Axio Imager.M2 Apotome microscope at 40X magnification.

The transplant surfaces were calculated with Mercator Pro software (Explora Nova) and the transplant volume was calculated with the following formula: $V (\text{mm}^3) = [s_1 + s_2]/2] \times d$ (s = surfaces (mm^2) and d = distance in mm between 2 sections).

Behavioural study.

We examined whether cortical transplants can ameliorate the motor deficits induced by motor cortical lesion. Functional assessment was performed using the staircase test. After a training period and baseline scores acquisition, mice were randomly divided into four experimental groups: control (n=6), lesionned (n=6), lesionned and

transplanted without delay (n=8), lesionned and transplanted with delay (n=8). Mice were tested twice a week with the staircase test for 3 post-operative months.

The staircase test allows side-specific measurement in paw reaching ability (Montoya et al., 1991; Baird et al., 2001). Experimental procedure was designed based on the protocol described by (Baird et al., 2001). Mice were first habituated with sucrose reward pellets (20 mg, BioServe, Frenchtown, NJ) by placing approximately 50 pellets in each cage during three consecutive days. Second, mice were familiarized with the staircase apparatus (Campden Instruments, Loughborough, UK) during two consecutive days: during 30 minutes sessions, mice were placed on the apparatus and sucrose reward pellets were placed on the staircase steps and along the central wall. For a further 2 weeks training period, the staircase was filled with two pellets per step and mice were placed in start chamber for 15 minutes sessions. For data acquisition sessions, session duration was set at 30 minutes and one reward pellet was placed on each step of the staircase. Mice were food deprived 20h prior to testing. The number of pellets collected or displaced and the maximum distance reached were scored for each side.

Statistical analysis.

All the results concerning post-mortem and behavioural studies are expressed as mean \pm SD. For data concerning the transplant size, cellular proliferation, apoptosis and vascularization levels in the transplants, statistical significance was evaluated using a two-way analysis of variance (ANOVA) having as factors time (4 days; 7 days; 14 days) and group (transplantation without delay; transplantation with delay), followed by Fisher's PLSD post hoc test. Staircase test performance significance was evaluated by two-way repeated measures (RM) analysis of variance (ANOVA) having as factors time and group (control, lesionned, lesionned and transplanted

without delay, lesionned and transplanted with delay), followed by Fisher's PLSD post hoc test. Comparisons of the survival rates of the transplants were performed using Logistic Regression test. The level of statistical significance was set at P<0,05.

Results

Development of the transplants

To evaluate the effects of a delay between lesion and grafting on growth of transplanted tissue, the volume of the graft was measured at 3 different time points after transplantation. After 4 days post-grafting, there was no significant difference in the graft volume between the two groups of transplanted animals (without delay: $0,141 \pm 0,210 \text{ mm}^3$; with delay: $0,232 \pm 0,098 \text{ mm}^3$) (Fig.1 A,D). After 7 days post-grafting, tissue transplanted with a delay (Fig. 1J) almost filled the lesion cavity and its volume tended to be increased compared to animals transplanted without delay (Fig. 1G) (without delay: $0,158 \pm 0,197 \text{ mm}^3$; with delay: $0,758 \pm 0,332 \text{ mm}^3$). After 14 days post-grafting, the volume of tissue transplanted with delay (Fig. 1P) was significantly higher than without a delay (Fig. 1M and Fig. 2A) (without delay: $0,590 \pm 0,254 \text{ mm}^3$; with delay: $2,308 \pm 1,286 \text{ mm}^3$; P<0,0001). The graft size depends on the balance between cell death and/or proliferation. We hypothesized that the increase in graft size may be due either to a decrease in cell death or/and to an increase in cell proliferation.

Cell apoptosis in the grafts was detected by TUNEL assay at 4 days, 7 days and 14 days post-grafting. Numerous apoptotic cells were found in the transplants 4 days after transplantation but no significant difference in the number of TUNEL+ cells was found between the two transplanted groups (without delay: $126,307 \pm 82,276$; with delay: $103,2 \pm 98,877$) (Fig. 2B). After 7 days, apoptotic cell number in the transplants

decreased (without delay: $24,680 \pm 21,032$; with delay: $19,64 \pm 19,056$). Apoptotic cells became scarce after 14 days (without delay: $6,440 \pm 4,599$; with delay: $12,96 \pm 10,784$) and no significant difference was found between the two transplanted groups (Fig. 2B). Consistently, the survival rate of the transplants, calculated as the percentage of mice transplanted exhibiting a transplant at the time of analysis, was not statistically different between the two transplanted groups (without delay: 79%; with delay: 96%). To analyze graft cell proliferation, BrdU incorporation was measured. Quantification of BrdU⁺ cells in the transplants showed that a delay between lesion and transplantation significantly increased the grafted cell proliferation at the 3 time point used in this study (day 4: without delay $815,04 \pm 816,513$ and with delay $2616,787 \pm 1151,313$; P<0,05; day 7: without delay $1219,91 \pm 1027,952$ and with delay $3694 \pm 967,368$; P<0,05; day 14: without delay $2087,72 \pm 749,529$ and with delay $4794,24 \pm 1234,87$; P<0,001) (Fig. 1A-R and Fig. 2C). Our results suggest that increased graft size in delayed group was associated with increased cellular proliferation more than cellular apoptosis.

Vascularization of the graft

The grafted cells are dependent on host vascularization and blood supply for oxygen and metabolic compounds. We hypothesized that the observed increased cellular proliferation and graft size when transplanting with a delay of 1 week could be linked to increased vascularization of the grafts. Quantification of the CD31 immunostained blood vessels in the GFP⁺ grafts showed that a delay between lesion and transplantation leads to a transient but significant increase in grafts vascularization (day 4: without delay: $9,884 \pm 3,749$; with delay: $14,574 \pm 1,829$; P<0,05) (Fig. 2D, Fig. 3 A-F). However, at day 7 (without delay: $14,195 \pm 3,783$; with delay: $15,163 \pm 4,080$) (Fig. 2D, Fig. 3 G-L) and day 14 (without delay: $16,069 \pm 2,173$; with

delay: $16,896 \pm 3,774$) (Fig. 2D, Fig.3 M-R) no quantitative difference in graft vascularization was observed between the two transplantation groups (Fig. 2D). To examine the contribution of graft vs host endothelial cells to the newly developed vessel within the graft, we used antibodies against GFP and CD31. The combined GFP and CD31 staining revealed a difference in the origin of the endothelial cells found in the transplants. Indeed, very few CD31+/GFP+ blood vessels were found in the cortical tissue transplanted without delay after cortical lesion, indicating that the blood supply originated primarily from regenerated host vessels. By contrast, numerous CD31+/GFP+ blood vessels were found in the cortical tissue transplanted into the lesion cavity with a delay of 1 week indicating that in this case, the vascular supply of the graft is derived from both host and donor vessels. To confirm this observation, we transplanted motor cortical tissue obtained from wild type animals into the motor cortex of GFP animals to allow better visualization of the host blood vessels in the transplants. By doing so, we reached the same conclusion than above, i.e., that in delayed grafting, vascularization is derived from both host and transplant (Fig. 4 A-F).

In a complementary series of experiments, we carried out *in vivo* vascularization analysis of the grafts. Two groups of transplanted mice were repeatedly imaged to assess the time dependence of blood vessels densities as well as their nature inside the graft and surrounding brain tissue. Dark holes indicating the presence of necrotic areas were most often observed in central areas of the grafts while cell clusters were present at their periphery (Fig. 5A,B). No obvious correlation was found between the presence of such areas and the amplitude of local vascular densities (Fig. 5A-D). Average vascular density inside the graft seemed slightly larger in delayed than acute conditions (0.24 ± 0.08 acute n=8; 0.34 ± 0.08 delayed n=9, Fig. 5E) but difference

was not significant due to high inter-animal variability (Fig. 5E). Most striking difference between the two conditions lied in the vascular composition. While graft vascularization was exclusively composed of host blood vessels in acute conditions, it was more of a mixture of host and donor vessels in delayed conditions. Donor cells incorporated into vessel walls as early as 7 days after implantation (Fig. 5 F-I); they assembled into fully formed donor vessels after two weeks (Fig. 5 J-M) and remained in place for at least another month thereafter (not shown).

Axonal projections of transplanted neurons

We have previously shown that embryonic motor cortical tissue transplanted into the damaged motor cortex of adult mice immediately after cortical lesion send appropriate projections to cortical and subcortical targets of the motor cortex including long distance targets such as the spinal cord (Gaillard et al., 2007). In the present study, we examined the axonal projections of grafted neurons at 4, 7, 14 days and 3 months after transplantation either immediately or 7 days after motor cortical lesion.

At day 4, in the animal group without delay (n= 5), few GFP positive (GFP+) fibers were identified in the host cortex at approximately 150-250 μm from the graft-host border (Fig. 6A). At day 4 in the delayed group (n=5), the front of GFP+ axons was about 500 μm away from the graft-host interface in the cortex (Fig. 6B). At day 4, in both groups, transplanted neuronal cell bodies and processes expressed doublecortin (DCX) a marker for migrating neuroblasts. At day 7, in the group without delay (n= 5), GFP+ fibers left the graft and proceeded toward the underlying corpus callosum (cc) (Fig. 6C). At day 7, in the delayed group, (n= 5), a dense contingent of GFP+ fibers were found ipsilaterally within the cc and the lateral and medial cortex; in addition, developing axons were found ipsilaterally within the caudate putamen (CPu) and contralaterally in the cc, the motor cortex and CPu (Fig. 6D). Most

strikingly, the density of GFP axons was considerably higher both ipsi and contralaterally in the cortex and CPu compared with the no delay group 7 days post grafting (Fig. 7A,B). At day 14, in the group without delay (n= 5), GFP+ fibers progressed further tangentially in the host cortex and, for their major part, terminated within the deep cortical layers (Fig. 6E). In addition, GFP+ fibers crossed the cc and entered the CPu (Fig. 7C-D) and leading axons were found in the internal capsule (ic) (Fig. 7G,H). At day 14, in delayed group, the density of GFP axons was considerably higher both ipsi and contralaterally in the cortex, CPu and thalamus (Fig. 7E,F) compared with the no delay group. Fast developing fibers were also identified within the thalamus, cerebral peduncle (cp) and, in some cases, at pontine nuclei (Pn) level. Three months post grafting, in the group without delay (n= 5), a dense array of GFP+ fibers was found both ipsi and contralaterally within motor and sensorimotor cortices and mainly ipsilaterally within the dorsolateral CPu (Fig. 6G), which corresponds to the normal pattern of projection of motor cortex neurons (Fig. 6G). In addition GFP+ fibers were present, in the host thalamus, especially within the ventrolateral internal capsule, cerebral pedoncule and the pontine nuclei and in one third of the cases into the spinal cord.

Three months post grafting in delayed group (n= 8), GFP+ fibers were found in the same areas than in the case of grafting without delay but with a higher magnitude (Fig. 6H).

Strikingly, we observed that labeled fibers were found within the spinal cord in all transplanted animals in the delayed group compare to the no delay group (Fig. 7). One of the most notable features of this study was that a delay between cortical lesion and transplantation increased the density of projections developed by transplanted neurons towards all the motor cortex cortical and subcortical specific targets. The

number of fibers could not be quantified due to the very large number of projections developed by transplanted neurons, especially when transplantation was performed with a delay of one week after cortical lesion.

Functional recovery

Lesions of the forelimb representation area of the motor cortex produce skilled forelimb reaching deficits. The staircase test was previously used in order to analyze such deficits, after lesion and after grafting (Baird et al., 2001).

Four groups of animals (control, lesioned, transplanted without delay and transplanted with 1 week delay) were assessed for skilled reaching.

Quantification of the number of pellets collected with the forepaw contralateral to the lesion side showed that the lesioned group was significantly impaired compared to control group (percentage of baseline performance during post-operative sessions was respectively $82,3 \pm 21,4$ and $171,9 \pm 23,6$; $P < 0,001$) (Fig. 7J). Indeed, the lesioned group showed a strong deficit within the three first post-operative weeks (percentage of baseline performance: $45,5 \pm 9,09$) followed by a limited spontaneous functional recovery until the end of the experiment i.e., 3 months after transplantation (percentage of baseline performance: $88,8 \pm 15,3$) (Fig. 7J). Animals receiving a graft of embryonic tissue without delay tended to show improvement in performance relative to the lesion group, although this did not reach statistical significance (percentage of baseline performance during post-operative sessions is respectively $95 \pm 14,8$ and $82,3 \pm 21,4$) (Fig. 7J). Indeed, in this later case, graft induced recovery was not complete since the performance of mice grafted without delay did not reach control mice levels (percentage of baseline performance during post-operative sessions is respectively $95 \pm 14,8$ and $171,9 \pm 23,6$; $P < 0,001$) (Fig. 7J). Graft-mediated recovery tends to be increased when a delay of 1 week is introduced between lesion

and transplantation compared to transplantation immediately after cortical lesion (percentage of baseline performance during post-operative sessions is respectively 105,8±18,8 and 95±14,8) although this recovery did not reach control levels (percentage of baseline performance during post-operative sessions was respectively of 105,8±18,8 and 171,9±23,6; P<0,001) (Fig. 7J). During the first 3 post-operative weeks, loss of function tends to be reduced in both transplanted groups compared with lesioned group (percentage of baseline performance during post-operative sessions without delay: 79,2±7,2; with delay: 91,7±22; lesion: 45,5±9,09) (Fig. 7J). Then, from 3,5 weeks to 3 month, there was non-significant increase in paw reaching performance between lesioned group and group transplanted without delay (percentage of baseline performance was respectively 88,8±15,3 and 97,8±14,1) (Fig. 7J). During this period, there was a non significant increase in performance between the group transplanted without delay and with delay (percentage of baseline performance is respectively 97,8±14,1 and 108,3±17,7) (Fig. 7J).

Discussion

The present study was carried out to examine the effects of a delay between adult motor cortical lesion and transplantation on graft survival, vascularization and connectivity of the grafted tissue as well as the impact on repair and recovery.

Our data show that (1) a delay between lesion and transplantation enhanced the transplant size, probably by increasing grafted cells proliferation, (2) The blood supply to the cortical tissue transplanted without a delay originated primarily from the regenerated host vessels. By contrast, the microvasculature of the cortical tissue transplanted into the lesion cavity with a delay of 1 week arises both from the transplanted tissue and sprouting of the host vessels. (3) The density of projections

developed by grafted neurons, towards appropriate cortical and subcortical targets is dramatically increased, by introducing a delay between lesion and transplantation.

Thus, our findings suggest that introducing a delay between the lesion and transplantation can significantly enhance graft vascularization, survival and the establishment of transplant-to-host projections.

Graft survival

The graft size depends on the balance between cell death and proliferation. In the present study, the combination of GFP to detect the graft cells, BrdU staining to detect cell proliferation and TUNEL staining to detect cell death allowed us to perform a rigorous assessment of grafted cell proliferation and survival following cortical lesion. We have shown that a delay between lesion and transplantation significantly increased the grafted cell proliferation. Cell apoptosis does not appear to play a major role in graft size as the number of TUNEL+ grafted cells was low both in delayed and no delayed groups, at all survival time points investigated. Regarding grafts survival, our findings are consistent with previous studies showing robust graft survival rate by delaying transplantation compared with transplantation without delay (Miyoshi et al., 1995a, Kesslak et al., 1986). It has been suggested that injury induced trophic activity that in turn increased transplant survival. Injury induced trophic activity has been also shown to increase the survival of striatal cholinergic grafts after lesion of retrohippocampal several days before transplantation (Manthorpe et al., 1983), or by injecting extracts prepared from injured brain (Nieto-Sampedro et al., 1984).

Graft vascularization

One crucial issue for the survival of transplanted cells is the provision of oxygen and metabolic compounds. Grafted tissue survival also depends on interaction between host and fetal endothelial cells allowing the establishment of a functional

vascularization. Here, the graft vasculature was examined *in vivo* by bi photon microscopy and on brain sections and the graft microvasculature was quantified at different time after the transplantation. Quantification of the CD31 immunostained blood vessels in the GFP⁺ grafts showed that a delay between lesion and transplantation leads to a transient but significant increase in graft vascularization 4 days after transplantation. The importance of vascularization for the survival of transplants has been previously highlighted more than three decades ago. For instance, it has been documented that cell survival of transplanted neurons can be improved if grafts were placed in highly vascularized areas of the host such as the anterior eye chamber (Olson et al., 1982) or the median eminence (Rosenstein et al., 1978). It has been suggested that a delay between lesion and transplantation induces the development of blood vessels and the release of neurotrophic factors enhancing the grafts cell survival (Johansson & Grabowski, 1994). In the same line, an increase in vascular density around cortical lesion cavity made 4 days before in the rat was previously reported and it was also proposed that the regenerated vessels might offer a favourable condition for graft survival (Miyoshi et al., 1995a; Miyoshi et al., 1995b). Our data show that the blood supply to the cortical tissue transplanted without a delay originated primarily from regenerated host vessels. By contrast, the microvasculature of the cortical tissue transplanted into the lesion cavity with a one week delay arises both from the transplanted tissue and sprouting of host vessels. Expression of proangiogenic factors that are yet to be determined and that stimulate host and graft angiogenesis might be implicated. Among these potential proangiogenic factors, expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in traumatic brain injury by early-activated microglia/ macrophages was previously shown to cumulate by days 3–

6 (Bartholdi et al., 1997; Julian et al., 1989, Nag et al., 2002; Nag et al., 1997; Skold et al., 2005).

Axonal projections of transplanted neurons

The potential effectiveness of neural transplantation depends on the level of reconstruction of damaged pathways (Wictorin et al., 1990). In the cerebral cortex, point-to-point innervation of target areas by the transplant neurons is critical. We have previously shown that embryonic motor cortical neurons transplanted into immediately lesioned motor cortex of adult mice develop appropriate cortical and subcortical projections similar to that found in normal animals (Gaillard et al., 2007). In the present study we have shown for the first time that, axonal projection of transplanted motor cortical neurons was dramatically increased when transplantation was performed with a delay of one week. Indeed, we observed massive graft projections to the host cortex, caudate putamen, the thalamus and spinal cord. More importantly, in all transplanted cases with a delay, grafted neurons extended axons over remarkably long distances to the spinal cord.

Functional recovery

Lesions of the forelimb representation area of the motor cortex produce skilled forelimb reaching deficits. Several studies, have examined the functional outcome of embryonic cell transplantation following cerebral cortex lesions in adult rats and the results are subject to controversy. For instance, Plumet et al. (1993) have shown that grafts of embryonic motor cortex into the lesioned motor cortex in adult rats induced partial reduction of deficit in skilled forelimb reaching. In contrast, Kolb et al. (1988, 1994) did not observe behavioural recovery after transplantation of embryonic frontal cortex into the lesioned frontal cortex. Our results show deficit of contralateral forelimb in the lesioned group, compared to control group, within the three first post-operative weeks followed by a limited spontaneous functional recovery until the end

of the experiment. Animals receiving a graft of embryonic tissue with or without delay showed also a performance improvement, but that was not statistically significant from that of the lesioned groups. The capacity of the graft to induce recovery of lost functions depends mainly on the formation of connections between transplanted neurons and host (Bjorklund & Stenevi, 1979; Bjorklund et al., 1980; Gaillard et al., 2009; Gaillard & Jaber, 2011). In our study, we did not observe an increase of functional recovery following grafting despite a large number of projections developed by grafted neurons to appropriate cortical and subcortical areas. Many variables, such as low number of subjects in each group, pre and post-operative training, may account for lack of additional motor recovery observed in transplanted compared to lesioned animals. Indeed, it has been shown that following cortical transplantation forelimb training (Riolobos et al., 2001) or pharmacological treatments (Feeney & Sutton, 1987) both enhance recovery compared to control animals. Accordingly, Mayer et al. (1992), reported that after embryonic striatal transplantation in adult rats with a striatal lesion, post operative training optimized the efficacy of graft-induced recovery, suggesting that animals may need to learn to functionally integrate the transplant to obtain behavioural recovery.

Taken together, our results show that introducing a delay between the lesion and transplantation can significantly enhance graft vascularization, survival and the establishment of transplant-to-host projections. Additional experiments are underway to assess more rigorously the potential effect of graft-induced functional recovery.

Bibliography

- Baird, A.L., Meldrum, A., & Dunnett, S.B., 2001. The staircase test of skilled reaching in mice. *Brain Res Bull.* 54, 243-250.
- Bartholdi, D., Rubin, B.P., & Schwab, M.E., 1997. VEGF mRNA induction correlates with changes in the vascular architecture upon spinal cord damage in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2549–2560.
- Bessert, D.A., & Skoff, R.P., 1999. High-resolution *in situ* hybridization and TUNEL staining with free-floating brain sections. *J Histochem Cytochem.* 47, 693-702.
- Björklund, A., & Stenevi, U., 1979. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res.* 30, 555-560.
- Björklund, A., Dunnett, S.B., Stenevi, U., Lewis, M.E., & Iversen, S.D., 1980. Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Res.* 199, 307-333.
- Feeney, D.M., & Sutton, R.L., 1987. Pharmacotherapy for recovery of function after brain injury. *Crit Rev Neurobiol.* 3, 135-197.
- Fenrich, K.K., Weber, P., Hocine, M., Zalc, M., Rougon, G., & Debarbieux, F., 2012. Long-term *in vivo* imaging of normal and pathological mouse spinal cord with subcellular resolution using implanted glass windows. *J Physiol.* 590, 3665-3675.
- Gaillard, A., & Roger, M., 2000. Early commitment of embryonic neocortical cells to develop area-specific thalamic connections. *Cereb Cortex.* 10, 443-453.
- Gaillard, A., Prestoz, L., Dumartin, B., Cantereau, A., Morel, F., Roger, M., & Jaber, M., 2007. Reestablishment of damaged adult motor pathways by grafted embryonic cortical neurons. *Nat Neurosci.* 10, 1294-1299.

- Gaillard, A., Decressac, M., Frappé, I., Fernagut, P.O., Prestoz, L., Besnard, S., & Jaber, M., 2009. Anatomical and functional reconstruction of the nigrostriatal pathway by intranigral transplants. *Neurobiol Dis.* 35, 477-488.
- Gaillard, A., & Jaber, M., 2011. Rewiring the brain with cell transplantation in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 34, 124-133.
- Giulian, D., Chen, J., Ingeman, J.E., George, J.K., & Noponen, M., 1989. The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. *J. Neurosci.* 9, 4416–4429.
- Johansson, B. B., & Grabowski, M., 1994. Functional recovery after brain infarction: plasticity and neural transplantation. *Brain Pathol.* 581, 156-160.
- Kesslak, J. P., Brown, L., Steichen, C., & Cotman, C. W., 1986. Adult and embryonic frontal cortex transplants after frontal cortex ablation enhance recovery on a reinforced alternation task. *Exp Neurol.* 94, 615–626.
- Kolb, B., Muirhead, D., & Cioe, J., 1994. Neonatal frontal cortex grafts fail to attenuate behavioural deficits or abnormal cortical morphogenesis. *Brain Res.* 467, 15-22.
- Kolb, B., Reynolds, B., & Fantie, B., 1988. Frontal cortex grafts have opposite effects at different postoperative recovery times. *Behav Neural Biol.* 50, 193-206.
- Manthorpe, M., Nieto-Sampedro, M., Skaper, S.D., Lewis, E.R., Barbin, G., Longo, F.M., Cotman, C.W., & Varon, S., 1983. Neuronotrophic activity in brain wounds of the developing rat. Correlation with implant survival in the wound cavity. *Brain Res.* 267, 47-56.
- Mayer, E., Brown, V. J., Dunnett, S. B., & Robbins, T. W., 1992. Striatal graft-associated recovery of a lesion-induced performance deficit in the rat requires learning to use the transplant. *Eur J Neurosci.* 4, 119–126.

- Miyoshi, Y., Date, I., & Ohmoto, T., 1995. Neovascularization of rat fetal neocortical grafts transplanted into a previously prepared cavity in the cerebral cortex: a three-dimensional morphological study using the scanning electron microscope, *Brain Res.* 681, 131-40.
- Miyoshi, Y., Date, I., & Ohmoto, T., 1995. Three-dimensional morphological study of microvascular regeneration in cavity wall of the rat cerebral cortex using scanning electron microscope: implications for delayed neural grafting into brain cavities, *Exp. Neurol.* 131, 69-82.
- Montoya, C.P., Campbell-Hope, L.J., Pemberton, K.D., & Dunnett, S.B., 1991. The « staircase test »: a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods.* 36, 219-228.
- Nag, S., Takahashi, J.L., & Kilty, D.W., 1997. Role of vascular endothelial growth factor in blood-brain barrier breakdown and angiogenesis in brain trauma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 912–921.
- Nag, S., Eskandarian, M.R., Davis, J., & Eubanks, J.H., 2002. Differential expression of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and VEGF-B after brain injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 778–788.
- Nieto-Sampedro, M., Whittemore, S.R., Needels, D.L., Larson, J., & Cotman, C.W., 1984. The survival of brain transplants is enhanced by extracts from injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81, 6250-6254.
- Olson, L., Seiger, A., & Stromberg, I., 1982. Intraocular transplantation in rodents: a detailed account of the procedure and example of its use in neurobiology with special reference to brain tissue grafting. In S. Federoff and L. Hertz (Eds.), *Advances in Cellular Neurobiology*, Vol. 4, Academic Press, New York, 407-442.

- Plumet, J., Ebrahimi, A., Guitet, J., & Roger, M., 1993. Partial recovery of skilled forelimb reaching after transplantation of fetal cortical tissue in adult rats with motor cortex lesion - anatomical and functional aspects. *Restor Neurol Neurosci.* 6, 9-27.
- Riolobos, A.S., Heredia, M., de la Fuente, J.A., Criado, J.M., Yajeya, J., Campos, J., & Santacana, M., 2001. Functional recovery of skilled forelimb use in rats obliged to use the impaired limb after grafting of the frontal cortex lesion with homotopic fetal cortex. *Neurobiol Learn Mem.* 75, 274-292.
- Rosenstein, J.M., & Brightman, M.W., 1978. Intact cerebral ventricle as a site for tissue transplantation. *Nature.* 275, 83-85.
- Skold, M.K., von Gertten, C., Sandberg-Nordqvist, A.C., Mathiesen, T., & Holmin, S., 2005. VEGF and VEGF receptor expression after experimental brain contusion in rat. *J. Neurotrauma.* 22, 353-367.
- Wictorin, K., Brundin, P., Gustavii, B., Lindvall, O., & Bjorklund, A., 1990. Reformation of long axon pathways in adult rat central nervous system by human forebrain neuroblasts. *Nature.* 347, 556-558.
- Whishaw, I.Q., O'Connor, W.T., & Dunnett, S.B., 1986. The contributions of motor cortex, nigrostriatal dopamine and caudate-putamen to skilled forelimb use in the rat. *Brain.* 109, 805-843.

Figure legends

Figure 1. Graft development and cell proliferation. Low magnification photomicrographs of coronal sections showing BrdU+ cells (in red) in the GFP+ transplants (in green) at 4 days (A,D), 7 days (G,J) and 14 days (M,P) after transplantation without delay (A,G,M) or with delay (D,J,P) after cortical lesion. High magnification images from regions of interest located inside the graft showing BrdU⁺ cells (in red) in the GFP⁺ transplants (in green) at 4 days (B,C and E,F), 7 days (H,I)

and K,L) and 14 days (N,O and K,R) after transplantation without delay (B,C; H,I and N,O) or with delay (E,F; K,L and Q,R) after the cortical lesion. The increased number of proliferating cells is correlated with an increased size of the grafts when transplantation is performed with delay (D-F,J-L and P-R) compared with no delay group (A-C,G-I and M-O). cc: corpus callosum, CPu: caudate putamen, Cx: cortex. Scale bars: (A,D,G,J,M,P) 600 μm , (B,C,E,F,H,I,K,L,N,O,Q,R) 90 μm .

Figure 2. Quantitative analysis of the development and the vascularization of the transplant. (A) Measurement of the size of the transplants (mm^3) at different time points (4, 7, 14 days) after transplantation without delay or with delay after the cortical lesion. A significantly increase in the volume of the transplants is observed after 14 days when transplantation is performed one week after the cortical lesion compared with no delay group. (B) Quantification of the TUNEL+ cell number in the transplants at 4, 7 and 14 days after transplantation without delay or with delay after the cortical lesion. The post-lesion time of transplantation doesn't influence the number of transplanted cells undergoing apoptosis process. (C) Quantification of the BrdU⁺ cell number in the transplants at 4, 7 and 14 days after transplantation without or with delay after the motor cortex lesion. A significant increase in the number of BrdU⁺ cells is found in the transplants for the 3 time points used in this study when transplantation is performed with delay after the cortical lesion. (D) Measurement of the vascularization of the transplants expressed as the CD31+ blood vessels surface/GFP+ graft surface ratio at 4, 7 and 14 days after transplantation without delay or with delay after the cortical lesion. A significant increase in transplant vascularization is observed at 4 days after transplantation with delay after the cortical lesion compared with no delay group. Data are presented as group means \pm SD and

asterisk indicates significant inter-group differences (Two-way ANOVA followed by Fisher's PLSD, ***p<0,0001 ; **p<0,001 ; *p<0,05).

Figure 3. Vascularization of the transplant. Low magnification photomicrographs of coronal sections illustrating the immunolabelled CD31⁺ blood vessels (in red) in the GFP⁺ transplants (in green) at 4 days (A,B and D,E), 7 days (G,H and J,K) and 14 days (M,N and P,Q) after transplantation without delay (A,B; G,H and M,N) or with delay (D,E; J,K and P,Q) after the cortical lesion. High magnification images from regions of interest located inside the graft showing immunolabelled CD31⁺ blood vessels (in red) in the GFP⁺ transplants (in green) at 4 days (C,F), 7 days (I,L) and 14 days (O,R) after transplantation without delay (C,I,O) or with delay (F,L,R) after the cortical lesion. Cx: cortex. Scale bars: (A,B,D,E,G,H,J,K,M,N,P,Q) 480 μm, (C,F,I,L,O,R) 100 μm.

Figure 4. The origin of the blood vessels in the transplant. Low magnification photomicrographs of coronal sections showing the immunolabelled CD31⁺ blood vessels (in red) in the transplants at 14 days after transplantation in the motor cortex of GFP⁺ mice (in green) without delay (A,B) or with delay (D,E) after the cortical lesion. High magnification images from regions of interest located inside the graft showing the immunolabelled CD31⁺ blood vessels (in red) in the transplants at 14 days after transplantation in the motor cortex of GFP⁺ mice (in green) without delay (C) or with delay (F) after the cortical lesion. The data indicates that when transplantation is performed immediately after the cortical lesion, the vascularization of the transplants depends mainly on the regenerated host blood vessels (arrows). On the contrary, when transplantation is performed one week after the cortical lesion the

blood vessels in the transplants originate both from host (arrows) and donor (arrowheads) blood vessels. Cx: cortex. Scale bars: (A,B,D,E) 500 μm , (C,F) 100 μm .

Figure 5. Dynamic intravital imaging of vascular density inside the graft in acute or delayed grafting conditions. (A-D) Typical bicolor 3D projection images (grafted cells, green; blood supply, red) from images stacks of the entire window over a depth of 400 microns. Acquisitions were obtained either 4 days (D4) or 7 days (D7) post-grafting at cellular resolution. Dotted square highlight the typical field of view of the microscope. 25 such fields were stitched together to cover the whole window. Grafting had been performed either (A,B) immediately or (C,D) with one week delay from the day of cortical damage. Dark holes (*) were often seen inside the graft. Although green areas were overall similarly vascularized in one or other condition. (E) Plot of vessel densities inside the graft for every mouse of the two groups imaged at D4 or D7. Vessel densities were not significantly different between the two conditions ($P>0.1$). (F-M) Bicolor high resolution images from regions of interest located inside the graft. Corresponding blood vessels are presented separately in gray on each side. (G,I and K,M) Cells that had been grafted acutely remained away from blood vessels at all time (D7 & D14). (H,I) Cells that had been grafted with one week delay from the day of injury were found along blood vessels on D7. (L,M) On D14, the density of such cells was increased, eventually leading to networks of perfused tubular structures. Vessels were thus at least partially composed of differentiated grafted cells. Scale bars: (A-D) 400 μm , (F-M) 100 μm .

Figure 6. Developmental time-course and growth characteristics of graft projections (A-H). Confocal photomicrographs of coronal sections showing the GFP+ (in green)

transplants and their axonal projections. Four days after grafting the transplanted cortical embryonic neuroblasts co-expressing DCX (in red) extend axons towards the adjacent host cortex (A,B). Seven days after grafting, transplanted neuroblasts co-expressing DCX (in red) extend numerous axons towards the host ipsilateral motor cortex (C,D). When transplantation is performed immediately after the cortical lesion (C) few isolated GFP+ fibers are found in the underlying corpus callosum. When transplantation is performed one week after the cortical lesion (D) a dense array of GFP+ bundles of fibers extended through the underlying corpus callosum to reach subcortical targets such as the ipsilateral striatum and/or the contralateral cortex. Fourteen days (E,F) and 3 month (G,H) after grafting numerous GFP+ positive fibers are found in the adjacent cortex, corpus callosum and CPu. Note that for all motor cortex targets at all time points, the number of fibers is dramatically increased when the transplantation of the embryonic neurons is performed one week after the cortical lesion (B,D,F,H) compared with no delay group (A,C,E,G). cc: corpus callosum, CPu: caudate putamen, Cx: cortex, LV: lateral ventricle. Scale bars (A,B,E,F,H) 450 µm, (C) 520 µm, (D) 330 µm, (G) 500 µm.

Figure 7. (A-I) Axonal projections developed by transplanted neurons towards the cortical and subcortical motor cortex targets. High magnification confocal photomicrographs of coronal sections showing GFP+ grafted neurons projections towards the adjacent cortex, corpus callosum and dorso-lateral striatum at 7 days (A,C) and 14 days (B,D) after transplantation without delay (A,B) or with delay (C,D) after the motor cortex lesion. After 14 days post-grafting, GFP+ fibers are also found within distant subcortical motor cortex targets such as the thalamus (E,F) and the internal capsule (G,H) and they have reached the spinal cord (I,J) after 3 month post-

grafting. The density of projections developed towards all the motor cortex targets studied are strikingly increased when transplantation is performed one week after the cortical lesion (B,D,F,H,J) compared with no delay group (A,C,E,G,I). cc: corpus callosum, CPu: caudate putamen, Cx: cortex, ic: internal capsule, Pyx: pyramidal tract decussation, VL : ventrolateral thalamic nuclei. Scale bars: (A-H) 90 μ m, (I) 120 μ m.

(J) Staircase test performance. Mean number (normalized with pre-surgical values) of pellets consumed with the forepaw affected by the lesion (controlateral) during the total post-operative sessions, during the 3 first weeks post-operative sessions and during the post-operative sessions from 3,5 weeks to 3 month. Neuronal transplantation tends to protect from acute loss of motor functions within the 3 first post-operative weeks, especially when transplantation is performed one week after the cortical lesion. Transplanted embryonic neurons tendency to increase long term behavioural recovery of motor functions also tends to be improved when transplantation is performed one week after the cortical lesion compared with no delay group. These tendencies did not reach statistical significance. Data are presented as means \pm SD and asterisk indicates a difference with the control group (Two-way repeated measures ANOVA followed by Fisher's PLSD, ***p<0,0001 ; **p<0,001 ; *p<0,05). No significant differences were found between the others groups.

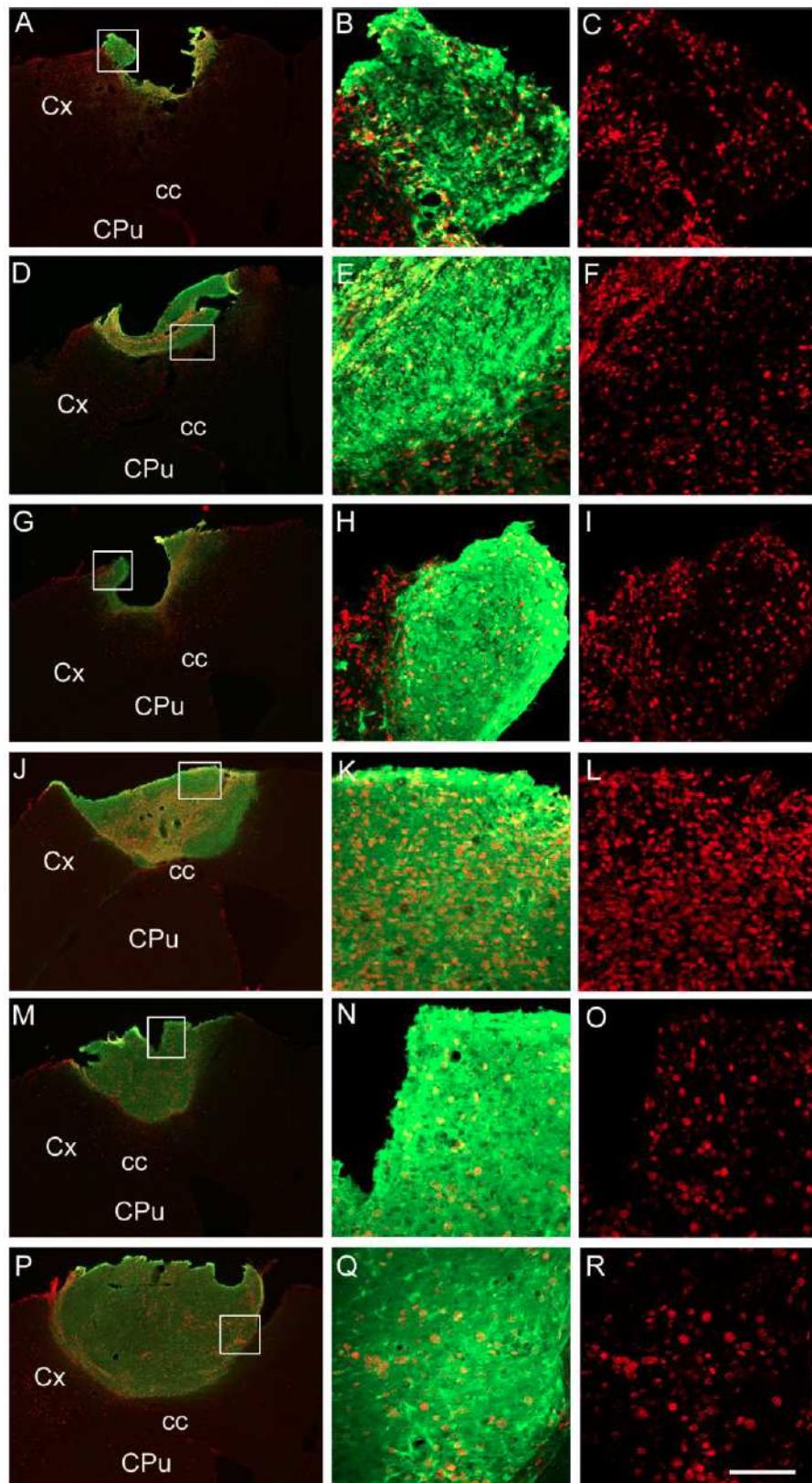


Figure 1

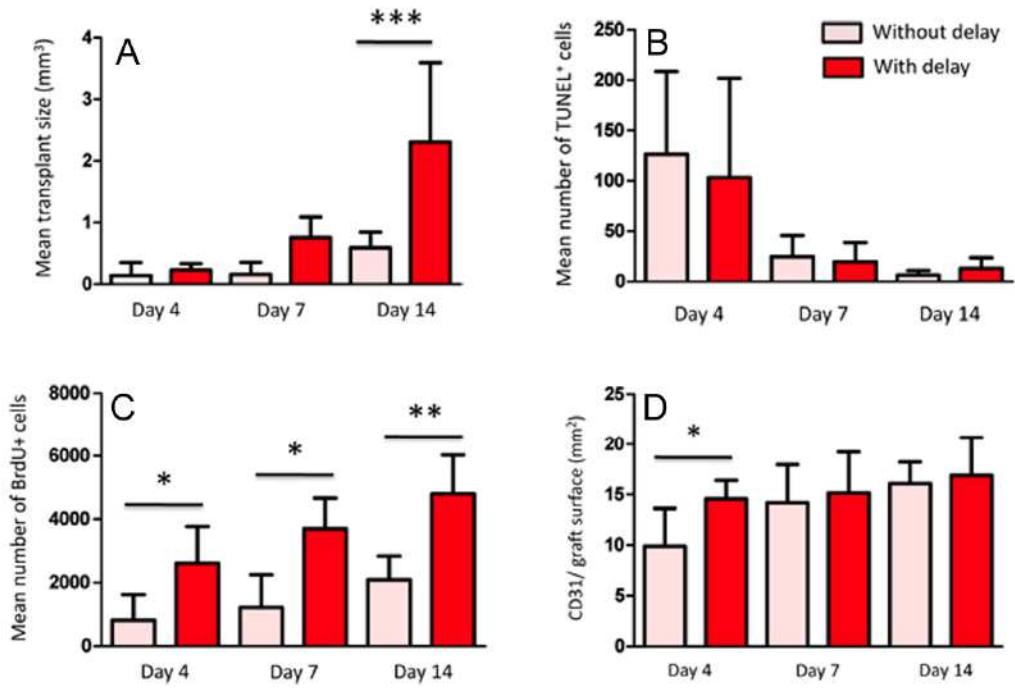


Figure 2

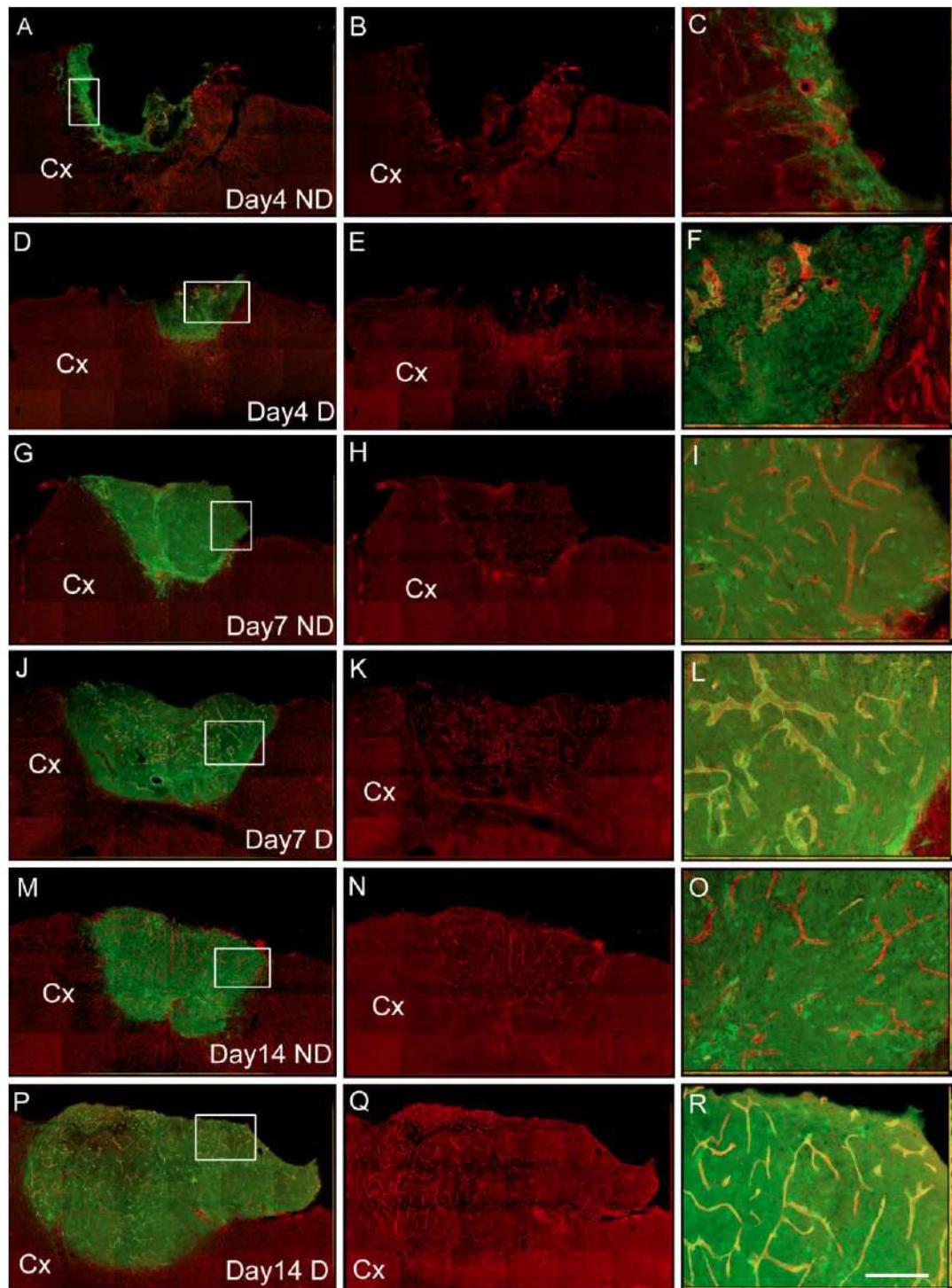


Figure 3

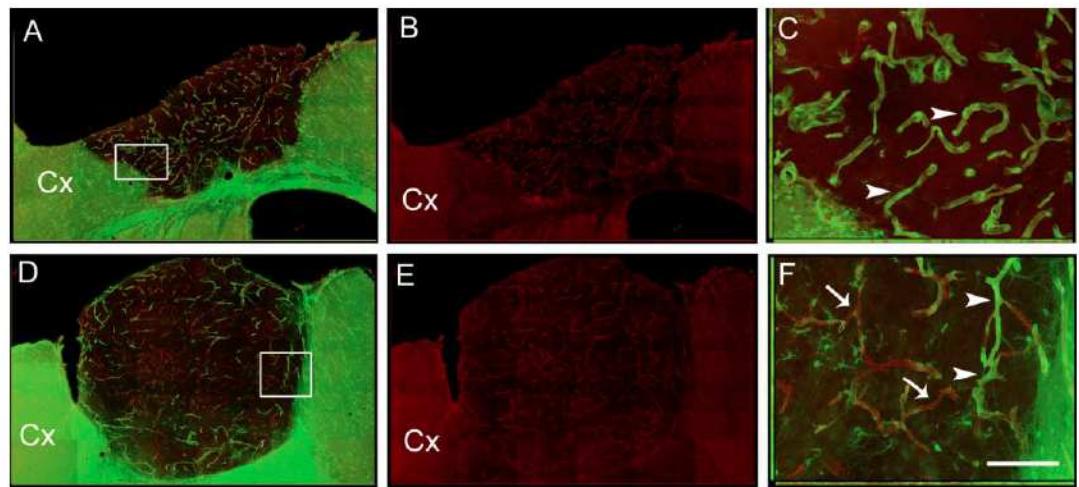


Figure 4

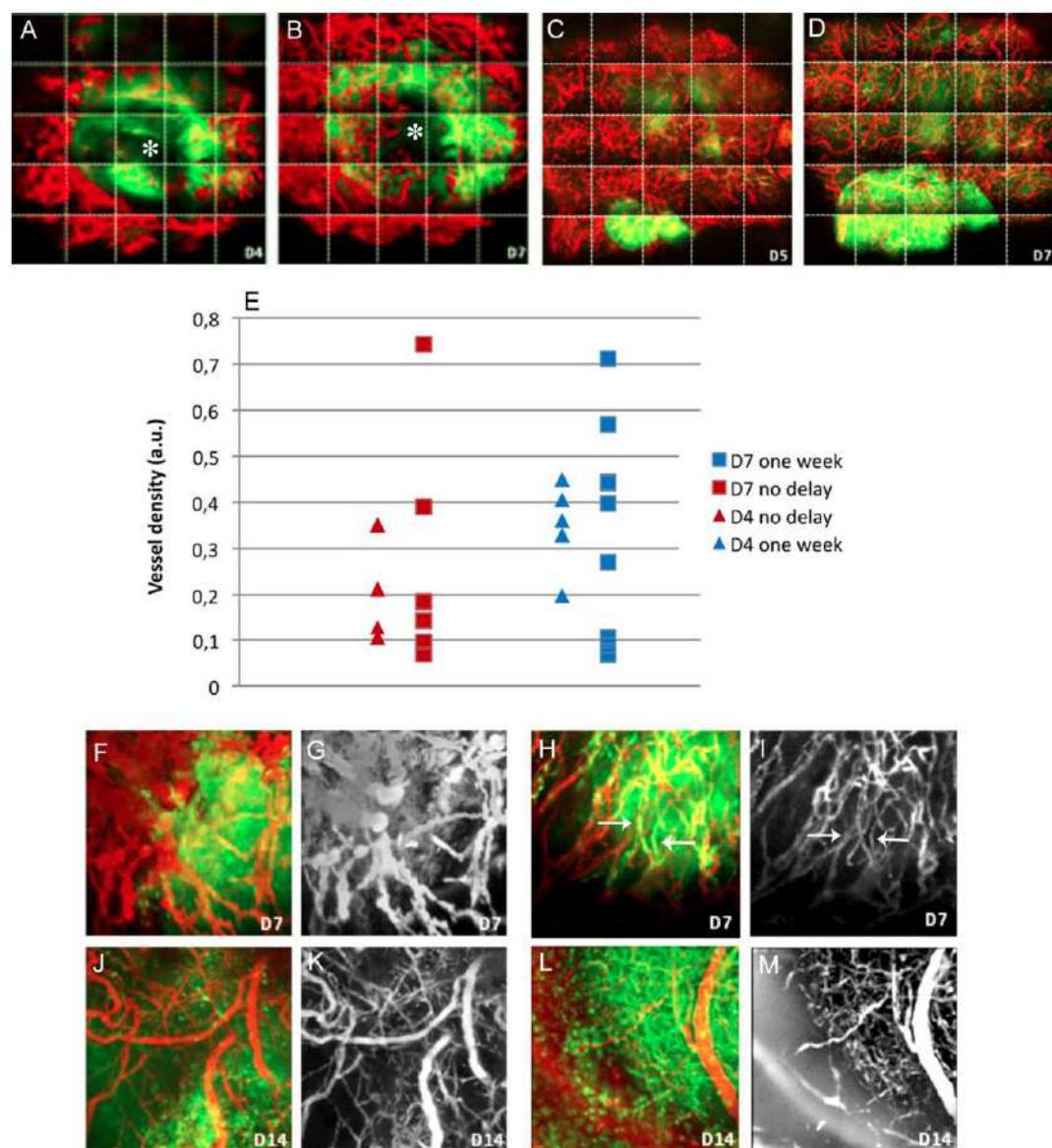


Figure 5

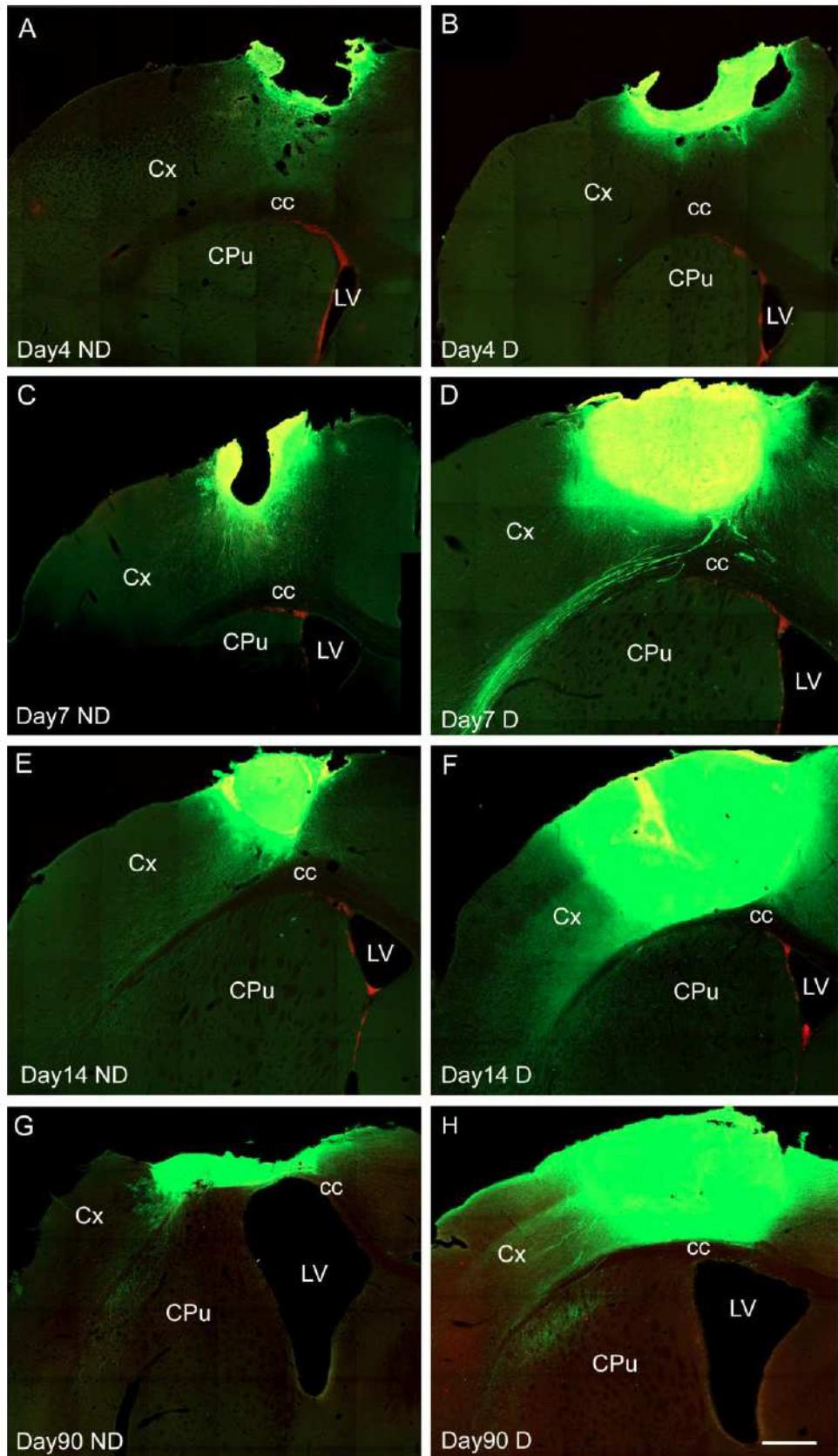
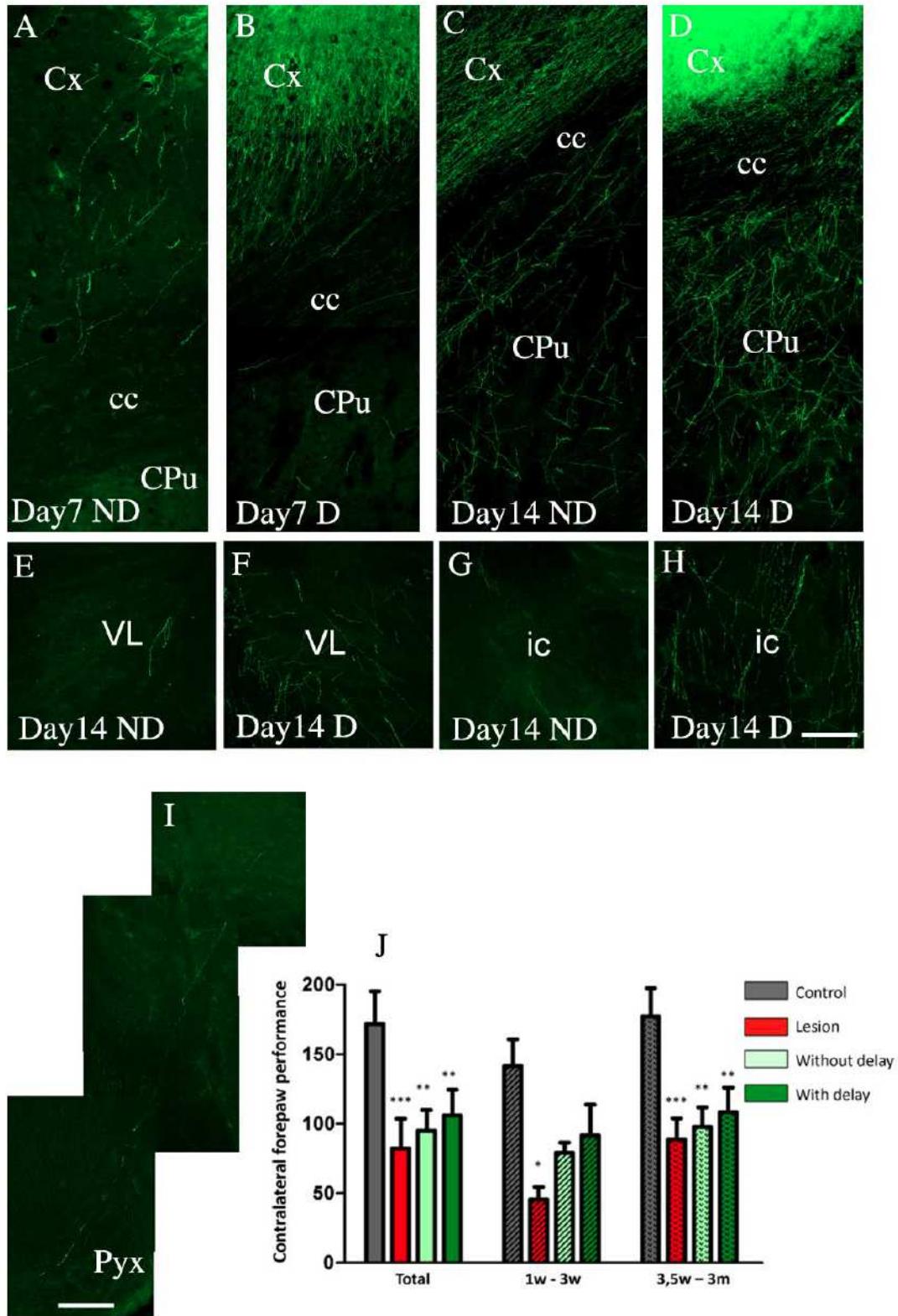


Figure 6

Figure 7

Résumé de l'article 3 (Publié dans *Neuron*)**La corticogenèse à partir de cellules souches pluripotentes humaines permet la génération de neurones pyramidaux présentant des propriétés hodologiques diverses et complexes.**

Le néocortex est une structure contenant de nombreux sous-types neuronaux qui participent à diverses fonctions via l'établissement de réseaux spécifiques de connexions avec les autres structures cérébrales. Pendant le développement, la régionalisation du cortex est acquise sous l'action coordonnée de morphogènes et de facteurs de croissance. L'organisation laminaire du cortex reflète l'origine dans le temps des neurones puisque les neurones des couches profondes sont générés en premier, avant les neurones des couches superficielles. Pendant l'évolution, et particulièrement chez l'humain, le cortex s'est complexifié, de nouvelles fonctions étant apparues via notamment une augmentation de la diversité cellulaire, l'apparition de nouvelles aires, et la mise en place de nouvelles connexions (pour revue, Clowry et al., 2010).

La génération de neurones corticaux *in vitro* à partir de cellules souches et la validation de leur propriétés *in vivo* après transplantation offre une solution alternative à la transplantation de neurones embryonnaires et permet la modélisation de phénomènes liés au développement ou aux pathologies corticales.

La génération *in vitro* de neurones corticaux à partir de cellules souches murines (Eiraku et al., 2008, Gaspard et al., 2008, Ideguchi et al., 2010) et humaines (Shi et al., 2012 ; Zeng et al., 2010) a été décrite précédemment. Cependant, l'intégration et le développement *in vivo* des neurones obtenus à partir de cellules souches humaines n'a pas été étudiée, et leur identité région-spécifique reste méconnue.

L'objectif cette étude, réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. Pierre Vanderhaeghen (Institut de Recherches en Biologie Humaine et Moléculaire, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles), a été d'évaluer la possibilité de générer des neurones corticaux *in vitro* à partir de cellules souches embryonnaires humaines (hESC) ou pluripotentes induites (hIPSC) selon une séquence respectant les étapes

de la corticogenèse *in vivo*, puis de valider leur spécificité par transplantation intracorticale.

Les hESC et hIPSC ont été cultivées dans un milieu de culture sans morphogènes pour mimer l'acquisition de l'identité du cerveau antérieur qui se fait *in vivo* en échappant à l'influence de signaux caudalisants ; et avec l'ajout d'un inhibiteur des BMP (bone morphogenetic protein), la noggine, afin d'augmenter l'induction neurale. *In vitro*, l'identité des neurones ainsi générés a été étudiée par différentes techniques de biologie moléculaire, et leur fonctionnalité a été évaluée par imagerie calcique et par électrophysiologie. Les neurones corticaux obtenus surexprimant la GFP sous le contrôle du promoteur Tau ont ensuite été greffés dans le cortex moteur de souris nouveau-né. Leur différenciation *in vivo* a été étudiée par immunomarquages, et le profil des projections qu'ils ont développées a été évalué par visualisation des fibres GFP⁺ et a été confirmé par l'injection de traceurs rétrogrades dans des régions cibles du cortex. Enfin, l'intégration neuroanatomique et fonctionnelle des neurones corticaux générés *in vitro* a été étudiée par microscopie électronique et en électrophysiologie sur tranches (patch clamp).

Les résultats de qRT-PCR et d'analyse des transcriptomes réalisées dans cette étude montrent que la culture *in vitro* de hESC et hIPSC sans ajout de morphogènes, et avec l'ajout de noggine, permet la génération de progéniteurs neuronaux d'identité corticale.

De plus, une majorité des neurones ainsi générés présentent des caractéristiques de neurones pyramidaux, sous-type neuronal majoritaire dans le cortex. En effet, apparaissent graduellement, selon une séquence temporelle semblable à celle observée sur des échantillons de cortex foetal humain, des neurones dont la morphologie, l'expression des transporteurs au glutamate, l'expression de gènes exprimés par les neurones pyramidaux matures et les propriétés fonctionnelles sont caractéristiques des neurones pyramidaux corticaux.

Par ailleurs, les neurones pyramidaux des différentes couches corticales sont générés selon une séquence temporelle appropriée puisque les neurones des couches superficielles apparaissent après ceux des couches profondes. De plus, la durée de culture cellulaire requise pour obtenir les neurones pyramidaux de toutes

les couches corticales *in vitro* à partir de cellules humaines est allongée par rapport à celle nécessaire dans le cas de cellules souches murines cultivées dans les mêmes conditions, reflétant ainsi les différences inter-espèces retrouvées *in vivo*. Cependant, comme dans le cas des neurones corticaux générés à partir de cellules murines, la proportion de neurones des couches profondes générés *in vitro* est plus importante comparé au cortex *in vivo*.

Enfin, des hESC ont été différencierées en neurones corticaux pendant 24 jours *in vitro*, puis transplantées dans le cortex frontal chez la souris nouveau-né. Les résultats obtenus *in vivo* après transplantation confirment les résultats obtenus *in vitro* : les cellules greffées expriment des marqueurs caractéristiques des neurones pyramidaux, et expriment les marqueurs des différentes couches corticales selon une séquence temporelle adéquate. De manière intéressante, la proportion de neurones des couches superficielles est supérieure à celle observée *in vitro*. L'analyse des projections développées par les neurones transplantés montre qu'elles sont spécifiques des différentes couches du cortex ; et leur mise en place coïncide également avec la séquence temporelle de génération des différentes couches corticales. Par ailleurs, l'analyse des différentes cibles recevant des projections des neurones transplantés indique que les neurones générés tendent vers une identité de type « cortex visuel ». Enfin, les neurones transplantés présentent des indices d'intégration fonctionnelle telles que l'établissement de contacts synaptiques avec l'hôte et la capacité de répondre à une stimulation lors d'enregistrements en patch-clamp.

En conclusion, la culture de cellules souches humaines sans ajout de morphogènes permet la génération séquentielle des neurones des différentes couches corticales avec une temporalité spécifique de l'espèce et conservée après transplantation *in vivo* ; et les neurones générés développent des profils de projection appropriés et s'intègrent fonctionnellement aux réseaux existants. Ces résultats ouvrent ainsi de nouvelles perspectives dans les domaines de la modélisation de pathologies corticales humaines et de la réparation cérébrale.

Pyramidal Neurons Derived from Human Pluripotent Stem Cells Integrate Efficiently into Mouse Brain Circuits In Vivo

Ira Espuny-Camacho,¹ Kimmo A. Michelsen,¹ David Gall,² Daniele Linaro,⁵ Anja Hasche,¹ Jérôme Bonnefont,¹ Camilia Bali,¹ David Orduz,² Angéline Bilheu,¹ Adèle Herpoel,¹ Nelle Lambert,^{1,8} Nicolas Gaspard,¹ Sophie Péron,⁴ Serge N. Schiffmann,² Michele Giugliano,^{5,6,7} Afsaneh Gaillard,^{4,*} and Pierre Vanderhaeghen^{1,3,*}

¹Université Libre de Bruxelles (U.L.B.), Institut de Recherches en Biologie Humaine et Moléculaire (IRIBHM), and ULB Neuroscience Institute (UNI), B-1070 Brussels, Belgium

²Laboratory of Neurophysiology and ULB Neuroscience Institute (UNI)

³Welbio

Université Libre de Bruxelles (U.L.B.), B-1070 Brussels Belgium

⁴INSERM U-1084, Experimental and Clinical Neurosciences Laboratory, Cellular Therapies in Brain Diseases group, University of Poitiers, F-86022 Poitiers, France

⁵Theoretical Neurobiology and Neuroengineering Laboratory, Department of Biomedical Sciences, University of Antwerp, B-2610 Wilrijk, Belgium

⁶Laboratory of Neural Microcircuitry, Brain Mind Institute, Swiss Federal Institute of Technology (EPFL), CH-1015 Lausanne, Switzerland

⁷Department of Computer Science, University of Sheffield, Sheffield S102TN, UK

⁸Medical Genetics Department, Université Libre de Bruxelles, Hôpital Erasme, B-1070 Brussels, Belgium

*Correspondence: afsaneh.gaillard@univ-poitiers.fr (A.G.), pierre.vanderhaeghen@ulb.ac.be (P.V.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.011>

SUMMARY

The study of human cortical development has major implications for brain evolution and diseases but has remained elusive due to paucity of experimental models. Here we found that human embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs), cultured without added morphogens, recapitulate corticogenesis leading to the sequential generation of functional pyramidal neurons of all six layer identities. After transplantation into mouse neonatal brain, human ESC-derived cortical neurons integrated robustly and established specific axonal projections and dendritic patterns corresponding to native cortical neurons. The differentiation and connectivity of the transplanted human cortical neurons complexified progressively over several months *in vivo*, culminating in the establishment of functional synapses with the host circuitry. Our data demonstrate that human cortical neurons generated *in vitro* from ESC/iPSC can develop complex hodological properties characteristic of the cerebral cortex *in vivo*, thereby offering unprecedented opportunities for the modeling of human cortex diseases and brain repair.

INTRODUCTION

The cerebral cortex is a complex cellular mosaic containing dozens of neuronal subtypes that display specific connectivity with the rest of the brain and thereby subserve highly diverse and elaborate functions.

Pyramidal neurons constitute more than 80% of cortical neurons and are further diversified in distinct cortical layers to establish specific patterns of axonal output and dendritic input, providing the essential substrate of cortical circuitry (Hevner, 2006; Molnár and Cheung, 2006; Molyneaux et al., 2007). For instance, layer VI neurons send their main projections to the thalamus, while most projections to midbrain, hindbrain, and spinal cord emerge from layer V neurons. Neurons from layer II/III, together with a subset of neurons from layer V, contribute to most intracortical projections, including the callosal projections to the contralateral cerebral hemisphere. In parallel, the cortical surface is parcellated into functional areas displaying modality-specific patterns of connectivity with the rest of the brain, such that, for instance, motor cortex will connect preferentially with thalamic and hindbrain motor nuclei and spinal cord, whereas visual cortex will project to visual centers in thalamus and midbrain (O'Leary and Sahara, 2008; Sur and Rubenstein, 2005; Vanderhaeghen and Polleux, 2004).

The cortex has undergone considerable complexification during recent primate evolution, characterized by an increase in the number and diversity of cortical neurons, additional cortical areas, and a relative expansion of cortical thickness (Hill and Walsh, 2005; Lui et al., 2011; Rakic, 2009). This evolution is probably linked to differences in the developmental features of corticogenesis (Bystron et al., 2008; Fish et al., 2008; Lui et al., 2011). These include longer phases of expansion of early cortical progenitors and prolonged periods of neurogenesis, taking several months in the human to allow the generation of many more cortical neurons (Bystron et al., 2006; Caviness et al., 1995; Rakic, 2009). In addition, late aspects of cortical neuronal differentiation, such as dendritic and synaptic maturation, are also protracted in time, and this neoteny may confer higher postnatal plasticity to the developing human brain (Defelipe, 2011; Petanjek et al., 2011).

Despite recent progress (Lui et al., 2011), the study of human-specific aspects of brain development has remained difficult. The advent of pluripotent stem cells, including embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) offers new opportunities to model human neural development and diseases (Dolmetsch and Geschwind, 2011; Han et al., 2011; Marchetto et al., 2010; Zhang et al., 2010). Directed differentiation of cortical neurons was previously described from mouse ESC (Eiraku et al., 2008; Gaspard et al., 2008). We reported the directed differentiation of mouse ESC into cortical neurons cultured without any morphogen (Gaspard et al., 2008, 2009), thus recapitulating the *in vivo* primitive pathway of forebrain induction (Wilson and Houart, 2004). After grafting in neonatal mouse brain, mouse ESC-derived cortical pyramidal neurons sent projections similar to those of the host cortex, providing demonstration of their cortical identity (Gaspard et al., 2008).

Although the generation of pyramidal neurons was also reported from human ESC/iPSC (Eiraku et al., 2008; Li et al., 2009; Shi et al., 2012; Zeng et al., 2010), it has remained unclear whether the mouse intrinsic pathway, followed in the absence of exogenous morphogens, was conserved in human cells. Besides, and most importantly, the exact identity of the human ESC-derived neurons generated has remained uncertain, since cardinal hodological features of cortical neurons, such as their patterns of axonal and dendritic projections, have never been tested by *in vivo* grafting.

Here, we show that the major hallmarks of corticogenesis can be recapitulated from human ESC and iPSC in the absence of added morphogens, up to the sequential generation of functional pyramidal neurons of diverse layer identities. After grafting in the mouse neonatal brain, human ESC-derived cortical neurons displayed robust and specific patterns of axonal projections and dendritic outgrowth and integrated functionally with the host synaptic circuitry, after a human-specific timeline. This enables the study of human cortex development and diseases in an *in vivo* context.

RESULTS

An Intrinsic Pathway from Human ESC/iPSC to Cortical Pyramidal Neurons

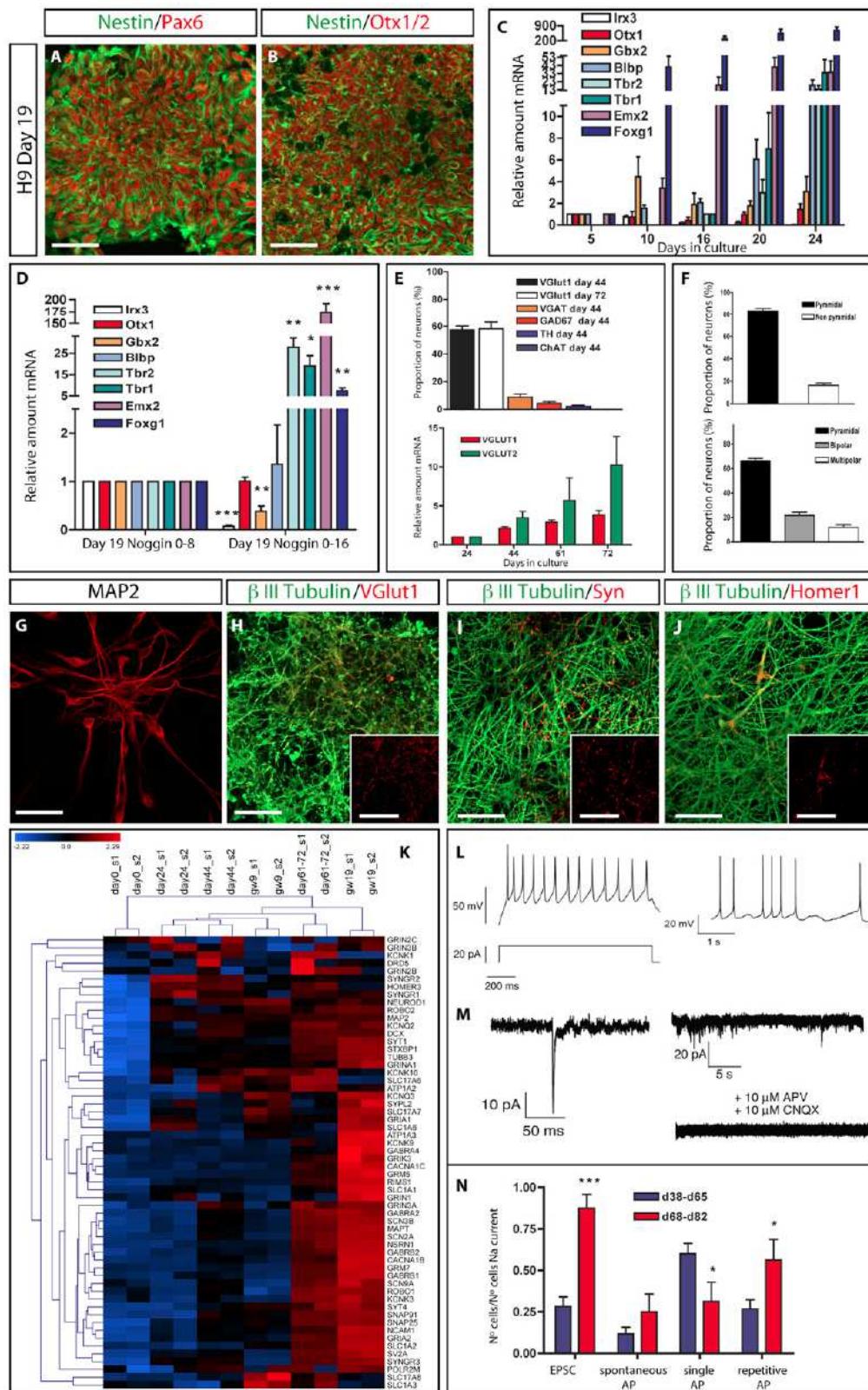
To determine whether the mouse ESC intrinsic pathway of corticogenesis (Gaspard et al., 2008) was conserved in human ESC, we adapted default culture conditions (Gaspard et al., 2009) to allow human cells to survive without added morphogens (see **Experimental Procedures** for details), supplemented with bone morphogenic protein (BMP) inhibitor Noggin to increase the rate of neural induction from human ESC and iPSC (Chambers et al., 2009; Pera et al., 2004). Over 10–19 days *in vitro* (DIV), human ESC mostly differentiated into Nestin-positive neural progenitors that coexpressed Pax6 and Otx1/2, consistent with the identity of early dorsal forebrain primordium (Inoue et al., 2000; Walther and Gruss, 1991) (Figures 1A and 1B and see Figure S2B available online). Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analyses revealed the gradual appearance of markers of neural progenitor (SOX1/BLBP) and of cortical identity (Otx1/EMX1/EMX2/FOXG1/PAX6/TBR2/TBR1) (Figures 1C and 1D,

Figure S2A). This pattern of regional identity was further investigated by microarray gene profiling experiments, in which the transcriptome of early differentiating cortical-like cells (24 DIV) was compared with those of undifferentiated human ESC and of human embryonic dorsal telencephalon at 9 gestational weeks (GWs). This revealed a strong upregulation of genes corresponding to telencephalon and/or cortical identity (Hébert and Fishell, 2008) during ESC-cortical differentiation, in striking similarity with the pattern of expression of the fetal cortical samples (Figure S2H). Conversely, the expression of markers of more caudal neural regions remained low in the hESC-derived neural cells as well as in the cortical human samples.

Notably, this robust telencephalic and/or cortical induction was only obtained after long (16 day) treatments with Noggin *in vitro*, as shorter treatments resulted in induction of genes corresponding mostly to diencephalon (*IRX3/GBX2*) (Figures 1C and 1D). Similar patterns of forebrain and/or cortical induction were obtained from different lines of ESC and iPSC (generated in this study; Figures S1 and S2C–S2G). Interestingly, unlike in mouse ESC corticogenesis (Gaspard et al., 2008), the induction of cortical identity did not require the inhibition of the Sonic Hedgehog (SHH) pathway, as previously reported (Li et al., 2009). Indeed, while SHH treatments resulted in expected ventral forebrain fates, cyclopamine (an inhibitor of SHH) did not result in significant changes in progenitor identity (Figure S3). These data show that in the absence of added morphogens but in the prolonged presence of the BMP inhibitor Noggin, human pluripotent stem cells efficiently convert to a population of neural progenitors that mostly correspond to a cortical identity.

We next assessed the identity, maturation, and functionality of the neurons generated from these progenitors. The majority of the β III-tubulin-positive neurons expressed the vesicular glutamate transporters 1/2 (VGLUT1/2) (Figures 1E and 1H) and displayed a unipolar and pyramidal morphology index (PMI) (Hand et al., 2005) corresponding to cortical glutamatergic pyramidal neurons (Figures 1F and 1G). After more than 2 months in culture, the neurons expressed markers of functionality, such as the presynaptic marker synaptophysin and the postsynaptic marker HOMER 1 (Figures 1I and 1J). Neuronal maturation during the human ESC-differentiation was further assessed by microarray profiling, in which the transcriptomes of ESC-derived differentiating cortical-like cells were compared with those of undifferentiated ESC and samples of human embryonic dorsal telencephalon at 9 GW and dissected cortical plate (thus containing mostly neurons) at 19 GW (Figure 1K). This revealed a gradual upregulation of genes typically expressed in mature neurons (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il>), culminating after 61–72 DIV, according to a pattern that is intermediate between those observed for human fetal cortical samples at 9 and 19 GW (Figure 1K; Tables S2 and S3).

We next determined more directly the functionality of the neurons, first by calcium imaging, which demonstrated spontaneous calcium waves that were blocked by tetrodotoxin (TTX) (Figure S4A and Movie S1). To confirm and characterize the functional maturation of ESC-derived neurons with time, we performed patch-clamp recordings, focusing on the evolution of passive membrane properties, excitability, and synaptic currents. This revealed a temporal evolution in the

**Figure 1. Default Generation of Functional Cortical Pyramidal Neurons from Human ESC/iPSC**

(A and B) Immunofluorescence staining for early forebrain primordium markers Nestin/Pax6 (A) and Nestin/Otx1/2 (B), after 19 days of differentiation.

(legend continued on next page)

electrophysiological properties of the cell population, with increased proportion of cells displaying induced repetitive firing and spontaneous synaptic currents (excitatory postsynaptic currents [EPSCs]) and, conversely, a reduced proportion of cells showing immature induced single action potentials (Figures 1L–1N, Figure S4, and Table S1). At the single cell level, we also observed an increase in the intensity of the voltage-dependent sodium current and in the amplitude of action potentials (Figures S4B–S4E and Table S1).

Altogether, these data demonstrate that human ESC-derived neurons gradually acquire *in vitro* all characteristic functional and morphological features of cortical pyramidal neurons.

A Species-Specific Sequence of Generation of Pyramidal Neurons of Diverse Layer Identities

Pyramidal neurons can be further subdivided by a repertoire of molecular markers identifying layer-specific neuronal populations (Gaspard and Vanderhaeghen, 2011; Molyneaux et al., 2007) (Figure 2J). Neurons from different layers are generated at distinct time points, where the earliest-born neurons generated in the cortex are pioneer neurons, followed by deep cortical layers VI and V, then by upper layers IV, and lastly layers II/III. To test whether a similar process occurred during corticogenesis from human ESCs, we determined the timing of onset of expression of layer-specific markers during the course of differentiation. The first neurons generated appeared around days 10–16 in culture (less than 1% of all cells) (Figure 2I, Figure S5P) and were positive for TBR1, calretinin, and reelin (markers of pioneer and Cajal-Retzius neurons) (Figures 2A, 2B, and 2I–2K). Later on, from around 40 DIV (a stage where 40% of the cells are neurons) (Figure 2I, Figure S5P), the proportion of TBR1-positive neurons kept increasing, while the proportion of calretinin neurons tended to decrease steadily (Figure 2I), suggesting that the majority of TBR1-positive/calretinin-negative neurons correspond to deep layer neurons VI and V (Figures 2I and 2J). This

was consistent with the appearance of FOXP2-positive and TBR1/CTIP2 double-positive neurons (layer VI) (Figures 2C, 2I, and 2J, Figures S6A–S6F) at 24–28 DIV, followed by CTIP2-positive neurons (layer V) at 37 DIV (Figures 2D and 2I–2K). Finally, SATB2-positive neurons, corresponding to callosal neurons from layers V and upper layer neurons, and CUX1/BRN2-positive neurons, corresponding to upper layer neurons, started to appear at the latest time points in culture (61–72 DIV) (Figures 2E–2G and 2I–2K). In addition, deep layer marker genes like FOXP1 and ETV1 were expressed from day 16 and displayed reduced expression from 61 DIV, at the onset of upper layer neuron generation (Figure 2K). Notably, there appeared to be a preferential bias toward the generation of deep layer fated neurons in the system, while upper layer neurons remained at low levels compared with the cortex generated *in vivo*, similarly to what we previously found during mouse ESC-derived corticogenesis (Gaspard et al., 2008).

Several other ESC and iPSC lines displayed a similar temporal pattern of neurogenesis, resulting in a comparable repertoire of neurons displaying diverse layer-specific patterns of identity (Figures S6G–S6K).

The repertoire of neuronal identity was further examined at a broader level using microarray profiling, focusing on 78 previously documented layer-specific genes (Bedogni et al., 2010; Molyneaux et al., 2007; Zeng et al., 2010). This revealed that most layer-specific genes were upregulated during hESC-corticogenesis, and their overall pattern appeared to be intermediate between those observed for human cortex samples at 9 and 19 GW, corresponding to most deep layer and a fraction of upper layer markers (Figure S7).

Corticogenesis from human ESC/iPSC thus follows a similar temporal sequence as from mouse ESC (Gaspard et al., 2008), but it extends over a period of time that is much more protracted (over 80 DIV instead of 20), strongly reminiscent of the extended timing of corticogenesis occurring *in vivo* in the human species

- (C) qRT-PCR analysis of human ESC-derived neural progenitors in culture. Data are shown as relative amount of mRNA compared to the values at day 5 of differentiation, as value $1 \pm \text{SEM}$ (fold change) ($n = 3\text{--}7$).
- (D) qRT-PCR analysis of the ESC-derived progenitors at day 19 of differentiation, after 8 or 16 days of treatment with noggin. Data are shown as relative amount of mRNA compared to the values of noggin 0–8 treatment, as value $1 \pm \text{SEM}$ (fold change) ($n = 3$).
- (E) Top: quantification of the proportion of BIII-tubulin-positive neurons expressing VGlut1 (days 44 and 72), VGAT (day 44), GAD67 (day 44), TH (day 44), and ChAT (day 44). Mean \pm SEM ($n = 2$ experiments). Bottom: qRT-PCR analysis of the expression of Vglut1 and Vglut2 after 24, 44, 61, and 72 days of differentiation. Data are shown as relative amount of mRNA compared to the values of day 24, as value $1 \pm \text{SEM}$ (fold change) ($n = 3$).
- (F) Top: proportion of neurons displaying a pyramidal morphology index (PMI) above the cutoff of 1.2. Mean \pm SEM ($n = 3$ experiments). Bottom: proportion of neurons displaying pyramidal, bipolar, or multipolar morphology. Mean \pm SEM ($n = 3$ experiments).
- (G) Immunofluorescence of ESC-derived neurons expressing MAP2 at day 72.
- (H) Immunofluorescence staining of ESC-derived neurons after 72 days of differentiation for BIII-tubulin (in green) and VGlut1 (in red). Magnification view of VGlut1 is depicted on the right bottom corner.
- (I and J) Immunofluorescence staining at day 82 of ESC-derived neurons for BIII-tubulin (in green) and synaptophysin (in red) (I) and HOMER1 (in red) (J). Magnification views of Syn and Homer1 are depicted on the right bottom corner.
- (K) Heatmap analysis showing the normalized expression of pyramidal neuronal maturation genes in two samples of undifferentiated H9 ESC at day 0 (s1, s2), two sets of cells differentiated for 24, 44, and 61–72 DIV (s1, s2), and two samples from human embryonic cortex at 9 and 19 gestational weeks (9/19 GW) (s1, s2). Top: legend showing color code for comparative levels of expression.
- (L) Representative traces of evoked (left) and spontaneous (right) action potentials from current-clamp recordings in ESC-derived neurons after 50–60 days of differentiation.
- (M) Two examples of excitatory spontaneous synaptic currents (EPSCs) recorded in ESC-derived neurons after 50 days in culture, inhibited by the application of APV and CNQX (right, below) (NMDA and AMPA receptor antagonists).
- (N) Graph showing the proportion of cells displaying EPSCs, spontaneous AP, induced single AP, and repetitive AP among cells with Na current at days 38–65 and days 68–82. Mean \pm standard error of the proportion (SEP) (days 38–65 $n = 61$, days 68–82 $n = 16$) (t test, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$). Scale bars represent 50 μm in (A and B) and in left of (H–J) and 25 μm in right of (H–J).

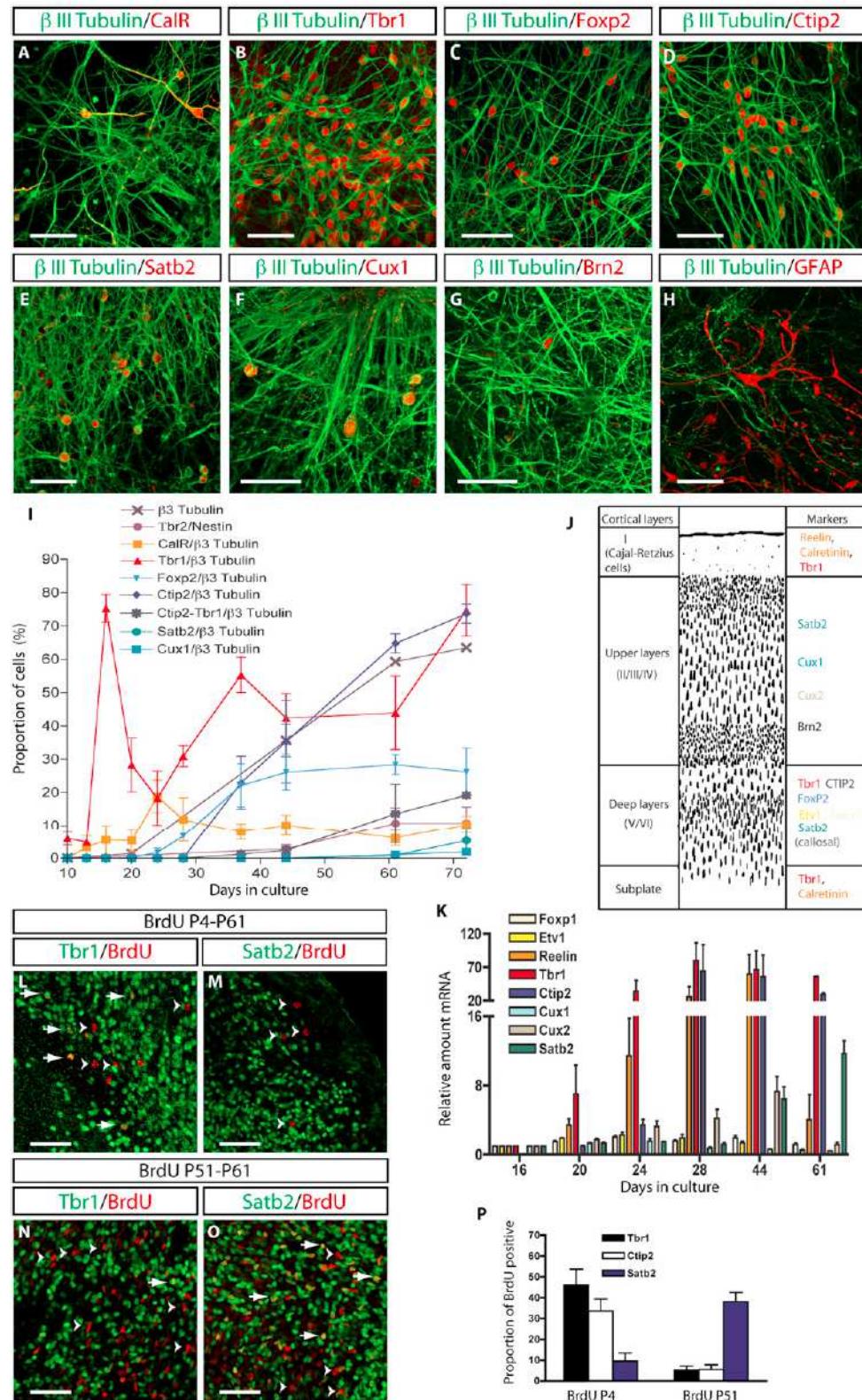


Figure 2. Sequential Generation of Human Pyramidal Neurons of Diverse Layer Identities In Vitro and after In Vivo Grafting

(A–I) A repertoire of distinct cortical neuronal and nonneuronal subtypes present after 72–82 days of differentiation. Markers (in red) calretinin (CalR) (A), TBR1 (B), FOXP2 (C), CTIP2 (D), SATB2 (E), CUX1 (F), and BRN2 (G) are all present in a proportion of β III-tubulin neurons (in green).

(legend continued on next page)

(Lui et al., 2011; Rakic, 1995). To test further the significance of these observations, we compared directly mouse and human ESC corticogenesis in identical conditions. Mouse and human ESC were cultured following the protocol optimized for human cells, both in the presence of cyclopamine to allow full dorsal specification of the mouse ESC-derived progenitors (Gaspard et al., 2008) (while cyclopamine was found to have no effect in the human system; Figure S3). Whereas the identity of early cortical progenitors was comparable between mouse and human at early and later stages (Figures S5A–S5C and data not shown), the appearance of BLBP-positive neurogenic radial glial cells and neurons were much delayed in the human cultures (Figures S5D–S5I and S5P). Moreover, while mouse cortical neurons of all layer identities were generated sequentially over 20 DIV, at the same stage only early pioneer TBR1-positive neurons could be detected from human ESC (Figures S5J–S5O). Overall these data indicate that *in vitro* cortical neurogenesis from human pluripotent stem cells is delayed and prolonged when compared to the mouse, thus mimicking the prolonged timeline of human corticogenesis (Lui et al., 2011; Rakic, 1995).

Human ESC-Derived Cortical Cells Engraft Robustly and Mature Following a Species-Specific Timeline in Mouse Newborn Cortex

The identity of a neuron is best attested by its hodological properties, and this is particularly important for cortical neurons, which display distinct patterns of axonal projections depending on their layer and/or areal identity.

To test this prominent aspect of cortical neuronal identity, we undertook grafting experiments in neonatal mice, a well-characterized paradigm to assess the hodological properties of projection neurons (Gaillard et al., 1998). For this purpose, we generated a human ESC line expressing green fluorescent protein (GFP) ubiquitously. GFP-positive hESCs were first differentiated into cortical-like cells for 24 DIV, then grafted into the frontal cortex of mouse neonates, and analyzed after up to 9/10 months posttransplantation (mpt).

Most of the grafts were located underneath or within the frontal cortex, with most of the GFP-positive cells remaining confined within the graft (Figures 3A and 4A). No evidence for teratoma formation was found 6–9 mpt (data not shown). Importantly, the human GFP-positive cells expressed in all cases a specific human nuclear antigen and showed no evidence of graft-to-host fusion (such as binucleated GFP cells) (Figures S8A–S8C).

The grafts mainly consisted of neurons, as shown by the GFP/βIII-tubulin double-positive cells at 1/2 mpt and GFP/MAP2 at 6 mpt (Figures S8D–S8I, S9A and S9B), with some Nestin-positive

progenitors still present at 1–2 mpt (data not shown). The grafted neurons were positive for the telencephalic marker FOXG1 (Figures S9A and S9B) and displayed appropriate molecular markers corresponding to cortical pyramidal neurons of different layer identities (Figure S9). This led us to test whether the temporal pattern observed *in vitro* was also present after *in vivo* grafting. We first observed that, while markers corresponding to deep layer neurons (TBR1, FOXP2, and CTIP2) could be readily detected after 1 mpt, the upper layer marker SATB2 was detectable in grafted neurons only at 2 mpt (Figures S9A and S9B). We next performed BrdU nuclear labeling experiments in the grafted mice to determine the date of birth of neurons of distinct layer identity. This analysis revealed that BrdU-labeled neurons that were born early (4 days after grafting) corresponded mostly to TBR1- or CTIP2-positive deep layer neurons, while those born later (51 days after grafting) corresponded mostly to SATB2-positive callosal and/or upper layer neurons (Figures 2L–2P). In addition, we found significant coexpression of TBR1 and CTIP2 (as found *in vivo*; McKenna et al., 2011) (Figures S6E and S6F) but largely mutually exclusive expression of SATB2 and CTIP2 in the human ESC-derived transplanted neurons (as found *in vivo*; Alcamo et al., 2008), further indicating that distinct cortical neuron populations are generated sequentially, even after *in vivo* transplantation into the mouse (Figures S9C and S9D).

Human ESC-Derived Cortical Neurons Project to Layer-Specific Targets

We next examined the axonal projections of the grafted neurons after 1–6 months and compared them with known endogenous patterns of projection of native cortical projection neurons. GFP-positive fibers were detected along the external capsule and corpus callosum, up to the ipsilateral and contralateral cortex (Figures 3A, 3C, and 3F and 4A and 4B). GFP-positive axons corresponding to subcortical projections were also detected along the internal capsule and cerebral peduncles and reached subcortical targets in the striatum, thalamus, midbrain, and hindbrain (Figures 3A, 3B, 3D, 3E, 3G, and 3H and 4A and 4C–4F). The pattern of axonal projections was cortex specific, i.e., graft-derived axons did not significantly innervate brain regions that are not targets of cortical neurons, such as substantia nigra or cerebellar structures (Figure 4M). Moreover, it confirmed the presence of neurons of diverse layer identities within the grafted cells, with projections to the thalamus (target of layer VI), striatum, midbrain/hindbrain (targets of layer V), and ipsi- as well as contralateral cortex (targets of layer II/III/V) (Figures 3 and 4).

(H) Immunodetection of astrocytes expressing GFAP (in red) and neurons expressing βIII-tubulin (in green) after 82 days of differentiation.

(I) Time course of the proportion of cells expressing markers of progenitors (TBR2), neurons (βIII-tubulin), and different layer-specific markers among the neurons after ESC differentiation. Mean ± SEM ($n = 2$ –4 experiments).

(J) Scheme depicting patterns of the layer-specific markers *in vivo*.

(K) qRT-PCR analysis showing the evolution in time of the expression of layer-specific markers. Data are shown as relative amount of mRNA compared to the values of day 16 as value 1 ± SEM (fold change) ($n = 2$ –4).

(L–O) Immunofluorescence images of BrdU-labeled cells (in red) and Tbr1 (in green) (L and N) or Satb2 (in green) (M and O) in mice BrdU injected at P4 and analyzed at P61 (L and M) or BrdU injected at P51 and analyzed at P61 (N and O). Arrows show colocalization of the two markers, and arrowheads show cells expressing only BrdU.

(P) Quantification of the proportion of Tbr1-, CTIP2-, or Satb2-positive cells among the BrdU-positive population 61 days after grafting, pulse chased 4 or 51 days after grafting. Mean ± SEM ($n = 80$ –100 neurons). Scale bars represent 50 μm.

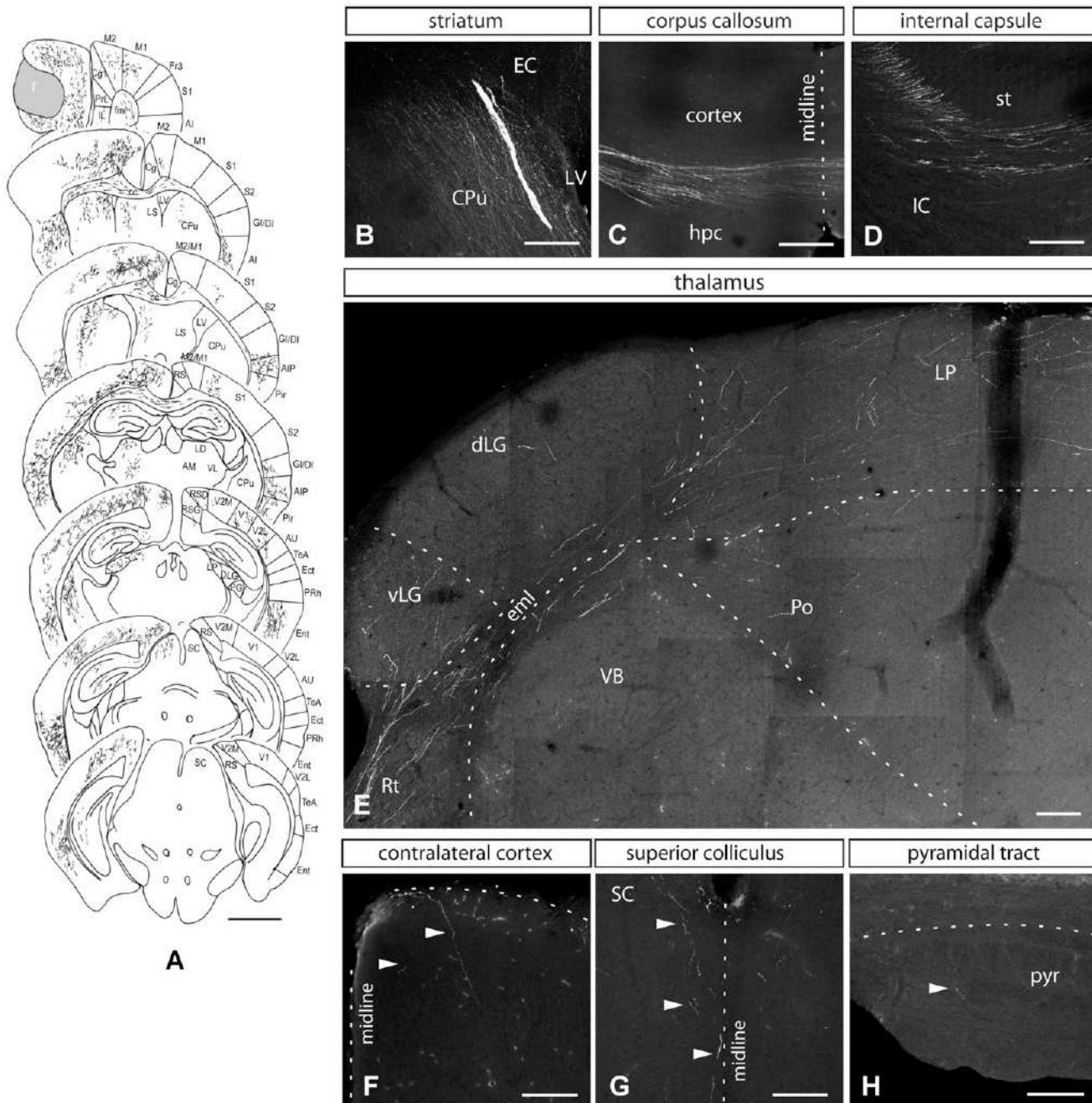


Figure 3. Human ESC-Derived Cortical Neurons Integrate and Send Cortical-like Axonal Projections after Grafting in Newborn Mouse Cortex
(A) Camera lucida drawing of the pattern of axonal projections 2 months after grafting. T, transplant. Abbreviations according to Paxinos and Franklin (1997).

(B–H) GFP-positive axonal projections detected by immunofluorescence in various brain structures 2 months after grafting. Fibers in the striatum (CPu) (B), corpus callosum (C), and internal capsule (IC) (D).

(E) Fibers enter the thalamus via the reticulocalcaneal nucleus (Rt) and reach the ventral lateral geniculate (vLG), dorsal lateral geniculate (dLG), and lateroposterior nuclei (LP) and, to a lesser extent, the ventrobasal-/posterior (VB) and posterior (Po) nuclei. eml, external medullary lamina.

(F–H) Fibers in the contralateral cortex (F), superior colliculus (SC) (G), and the pyramidal tract (Pyr) (H). EC, external capsule; hpc, hippocampus; IC, internal capsule; LV, lateral ventricle; st, stria terminalis. Scale bars represent 2 mm in (A) and 100 μm in (B–H).

Quantification of the projections at 1–6 months revealed an increase in the percentage of animals with far-reaching projections (in the midbrain and hindbrain including the pyra-

midial tract) (Figure S8L), as well as in the number of total axonal projections (Figures 4G–4J). Interestingly, the latter was most prominent when examining targets of late-generated neurons,

such as the striatum, midbrain/hindbrain (target of layer V), and contralateral cortex (target of layers II/III/V) (Figures 4G–4J). This time-dependent pattern of axonal projections is consistent with the sequential generation of these neurons, observed *in vitro* and *in vivo* from human ESC.

Finally, we looked at the direct relationship between patterns of axonal projections and expression of selective transcription factors, a striking feature of cortical projection neurons (Molneaux et al., 2007). For instance, CTIP2-positive neurons mostly correspond to layer V corticofugal neurons that target the midbrain, hindbrain, and spinal cord, while layer VI TBR1-positive neurons project mostly to the thalamus. We performed retrograde tracing experiments in animals 9 months after grafting, targeting the thalamus or the midbrain superior colliculus, combined with immunostaining of the retrogradely labeled grafted neurons, and compared their patterns with those of the host cortical neurons (Figure 5). Remarkably, this revealed that most (70%) of the grafted neurons retrogradely labeled from the thalamus were found to be TBR1 positive, while fewer (<30%) were CTIP2 positive, like layer VI host neurons (Figures 5A–5E). In contrast, most (>80%) of the grafted neurons that were retrogradely labeled from the midbrain were CTIP2 positive, while fewer (<35%) were TBR1 positive, as was observed for layer V host neurons (Figures 5A, 5B, and 5F–5H). While these data confirm the robustness of the axonal patterns of the grafted neurons, they also indicate that the expression of specific transcription factors is correlated with patterns of axonal projections of the grafted neurons, as for genuine cortical projection neurons.

Human ESC-Derived Cortical Neurons Project to Area-Specific Targets

We next examined the areal specificity of axonal projections, whereby projection neurons of distinct areas target diverse brain structures, such as visual nuclei for the visual cortex or pyramidal tract for motor cortex. Similar grafting experiments with mouse ESC-derived cortical neurons revealed specific patterns of projections, corresponding mostly to visual and limbic identity (Gaspard et al., 2008). Interestingly, quantitative examination of the human graft-derived axonal projections 2 mpt revealed a pattern that was also indicative of visual or limbic identity, with projections to visual and limbic targets in the thalamus (LG/LP/LD), dorsomedial (DM) striatum, and midbrain (SC/PAG) (Figures 3 and 4G–4L). However, at 6 mpt, the projections displayed a much broader pattern of areal identity, with axons reaching motor targets such as dorsolateral striatum (DL) and the pyramidal tract or somatosensory targets such as the somatosensory VB and Po nuclei (thalamus) (Figures 4A–4L). Consistent with a broader pattern of cortical areal identity at later stages, the visual or limbic cortex marker COUP-TFI was prominently expressed among the grafted neurons at 2 mpt but was much less prevalent in later generated neurons at 6–9 mpt (Figures S8J and S8K).

Human ESC-Derived Neurons Display Elaborate Patterns of Dendritic Outgrowth and Synaptogenesis

Pyramidal neurons also display specific patterns of dendritic orientation, growth, and targeting (Barnes and Polleux, 2009).

This important aspect of maturation and complexity could not be addressed for the majority of neurons, located within the bulk of the graft. However, in every case examined, a small number of neurons could be found outside of the graft, many of which had settled within the host cortex (Figure 6). Most of these neurons displayed a pyramidal morphology, with one larger apical dendrite oriented radially within the cortex (Figures 6A and 6B). When examined from 3 weeks to 2 mpt, they displayed relatively simple and immature patterns of dendritic growth (Figures 6A–6D). However, this pattern complexified dramatically with time (Figures 6A–6F), and at 9 mpt most neurons examined displayed elaborate dendritic growth and branching, highly reminiscent of mature pyramidal neurons (Figures 6F and 6G). Moreover, closer inspection of the dendrites revealed the presence of numerous dendritic spines (Figure 6H), suggesting that active synaptogenesis had taken place. Indeed, markers of glutamatergic neurons and pre- and postsynaptic components were abundantly detected in the graft (Figures 7A–7C). Electron microscopy combined with GFP immunolabeling confirmed the presence of numerous synapses from the grafted neurons to the host after 6 months, including at subcortical targets (Figures 7D–7F). Reciprocal synapses from the host to the grafted neurons were also observed (Figure 7G), and innervation of the graft by the host thalamus was confirmed by anterograde tracing (Figure 7I). This analysis also revealed GFP-positive fibers myelinated by the host, providing further indication of full integration in the host brain (Figure 7H).

Human ESC-Derived Neurons Are Functionally Integrated into the Mouse Cortical Microcircuitry

We then analyzed the functionality of human ESC-derived neurons integrated into the mouse cortex, using patch-clamp recordings on ex vivo brain slices acutely obtained from transplanted mice at 9 mpt (Figure 8). Strikingly, we found that all human neurons examined ($n = 9$, from 3 transplanted mice) displayed passive membrane properties and excitability typical of mature cortical neurons, with most of them ($n = 8/9$) displaying a regular accommodating firing pattern, characteristic of pyramidal neurons (Figures 8A–8C) (McCormick et al., 1985). We next assessed the incoming synaptic connectivity of the transplanted neurons. We first observed that all recorded neurons displayed at rest consistent spontaneous synaptic potential (PSP) occurrence, which could be blocked by glutamatergic receptor antagonists (CNQX and AP-V) (Figures 8D–8F), indicating the integration of ESC-derived neurons into glutamatergic circuits (Figures 8D–8F). Moreover and most strikingly, we tested the evoked responsiveness of the transplanted human neurons upon a train of extracellular electrical stimulations at a distance of the graft within the mouse host cortex. This evoked robust synaptic responses in all tested neurons that corresponded to glutamatergic and GABAergic inputs (Figures 8G and 8H), with short-term plasticity profiles common in cortical microcircuits (Reyes and Sakmann, 1999; Wang et al., 2006).

DISCUSSION

The mechanisms underlying human cortex development have major implications in neurobiology and neurology, but their study

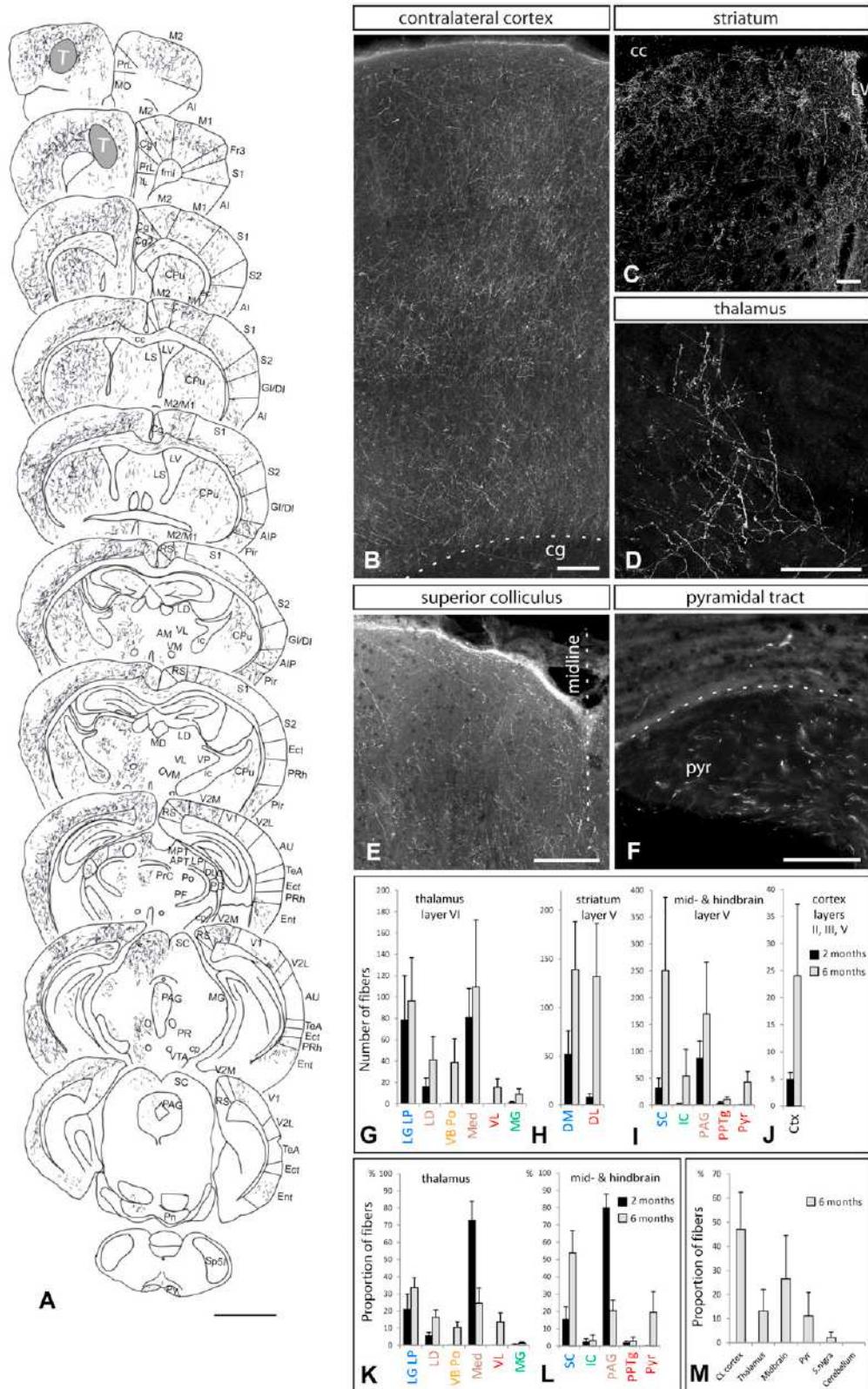


Figure 4. Maturation of the Pattern of Axonal Projections of ESC-Derived Neurons

(A) Camera lucida drawing of the pattern of axonal projections 6 months after grafting. T, transplant. Abbreviations according to Paxinos and Franklin (1997).

(legend continued on next page)

has remained difficult due to limited experimental accessibility to human fetal brain material. Here, we show that human corticogenesis from ESC and iPSC leads to a collection of functional neurons that display most salient features of native pyramidal neurons, including gene expression, morphology, physiology, and, most importantly, hodological properties assessed *in vivo* by robust and specific patterns of axonal and dendritic outgrowth and functional synaptic integration in the host circuitry.

The generation of cortical-like neurons was previously reported from human ESC and iPSC (Eiraku et al., 2008; Li et al., 2009; Shi et al., 2012; Zeng et al., 2010). However, since these protocols used cell aggregate cultures and/or added morphogens, it had remained unclear whether the intrinsic pathway uncovered in mouse (Gaspard et al., 2008) was conserved in human cells. Here, we report the robust differentiation of human ESC and iPSC into cortical neurons, following a monodifferentiation culture condition in a chemically defined medium devoid of added morphogens. While these data indicate that the absence of morphogens appears to be critical for both mouse and human ESC corticogenesis, there are also interesting and important differences between the two species, such as the required use of SHH antagonists in the mouse and of BMP antagonists in the human cells. In addition and most strikingly, the two systems differ greatly by their temporal appearance, which could be reminiscent of the *in vivo* temporal differences between the two species.

A highly conserved feature of cortical neuron specification is temporal patterning, whereby neurons of distinct layer identity are generated sequentially (Gaspard and Vanderhaeghen, 2011; Leone et al., 2008; Molyneaux et al., 2007; Okano and Temple, 2009). We observed a similar temporal patterning from human ESC and iPSC *in vitro* and, most strikingly, even after intracerebral grafting *in vivo*. Notably, like in the mouse ESC-derived corticogenesis, most of the pyramidal neurons generated here *in vitro* display an identity corresponding to deep layers, while upper layer neurons are underrepresented when compared to the *in vivo* situation. This contrasts with a recent report describing the generation of deep and upper layer neurons in equivalent proportions, from human ESC cultured in the presence of retinoic acid precursors (Shi et al., 2012). Moreover, we observed a higher proportion of upper layer neurons after transplantation than after purely *in vitro* conditions, while the generation of deep layer neurons appeared to be similarly efficient *in vitro* and *in vivo*. Overall, this could suggest that extrinsic cues, which are not added in our minimum

culture conditions and might be present in the neonatal mouse cortex, may be required for proper upper layer neuron specification.

The identity of cortical neurons can be best attested by their hodological properties, such as their patterns of axonal and dendritic projections. Our grafting experiments revealed robust and specific axon targeting to brain regions normally innervated by cortical neurons, as well as dendritic patterns corresponding to those of native pyramidal neurons, including the presence of dendritic spines. In addition, the grafted neurons appeared to correspond to a diverse repertoire of cortical neurons, as assessed by their pattern of axonal projections that corresponded to all cortical layers, which could be correlated with layer-specific gene expression. These data reveal a robust correlation between molecular and hodological properties of the grafted neurons, even for noncortical or mouse cells.

On the other hand, human ESC-derived cortical neurons displayed area-specific patterns of projections. We previously found that mouse ESC-derived neurons displayed specific patterns of axonal projections corresponding to visual and limbic occipital cortex (Gaspard et al., 2008). A similar axonal pattern was observed with human cortical cells 2 months after grafting, suggesting that *in vitro* corticogenesis can lead to occipital areal identity also in human cells. However, unlike in the mouse, after longer periods the axonal projections corresponded to a wider range of areal identities, including motor and somatosensory. These data suggest that specific patterns of visual or limbic areal identity may be acquired during *in vitro* differentiation from human ESC, like in the mouse, but that after grafting a substantial fraction of the cells can be specified to other areal identities over time, perhaps in relation with their earlier stage of maturation at the time of grafting. In support of this hypothesis, most of the grafted neurons expressed the occipital cortex marker COUP-TFI after 2 months, whereas far fewer neurons were found to be positive after 6–9 months. This is highly reminiscent of the data obtained with rodent native or ESC-derived cortical cells, which show different patterns of areal fate specification depending on their degree of commitment and maturation at the time of grafting (Hansen et al., 2011; Ideguchi et al., 2010; Pinaudeau et al., 2000). It will be interesting in the future to further test these issues, by characterizing the molecular areal identity of the transplanted neurons over time and by assessing the areal patterns of projections of ESC-derived cells differentiated for a longer time prior to transplantation and/or after transplantation into other areas, such as somatosensory or visual cortex.

(B–F) GFP-positive fibers detected within the contralateral cortex (B), striatum (C), thalamus (D), superior colliculus (E), and pyramidal tract (pyr) (F).

(G–J) Quantification of the distribution of GFP-positive fibers to the layer VI target thalamus (G), layer V target striatum (H), layer V target midbrain/hindbrain (I), and layer II/III/V target contralateral cortex (J) after 2 and 6 months. n = 12 for 2 months, n = 6 for 6 months. Medium values are given \pm SEM.

(K and L) Proportion of fibers within the different structures of the thalamus and mid/hindbrain after 2 and 6 months. n = 12 for 2 months, n = 6 for 6 months. Medium values are given \pm SEM, x axis color code refers to the areal specificity of innervation of each target examined: visual, blue; limbic, brown; somatosensory, orange; motor, red; auditory, green. LG, lateral geniculate; LP, lateroposterior; LD, laterodorsal; VB, ventrobasal; Po, posterior; Med, medial; VL, ventrolateral; MG, medial geniculate nucleus of the thalamus; DM, dorsomedial; DL, dorsolateral parts of the striatum; SC, superior colliculus; IC, inferior colliculus; PAG, periaqueductal gray matter; PPTg, pedunculopontine nucleus; Pyr, pyramidal tract.

(M) Quantification of the proportional distribution of GFP-positive fibers within cortical targets: contralateral cortex (CL cortex), thalamus (LG, LP, LD, VB, Po, Med, VL, MG), midbrain (SC, IC, PAG, PPTg), and pyramidal tract (Pyr), and within noncortical targets: substantia nigra (s. nigra) and cerebellum after 6 months. n = 6. Medium values are given \pm SEM. Scale bars represent 2 mm in (A) and 100 μ m in (B–F).

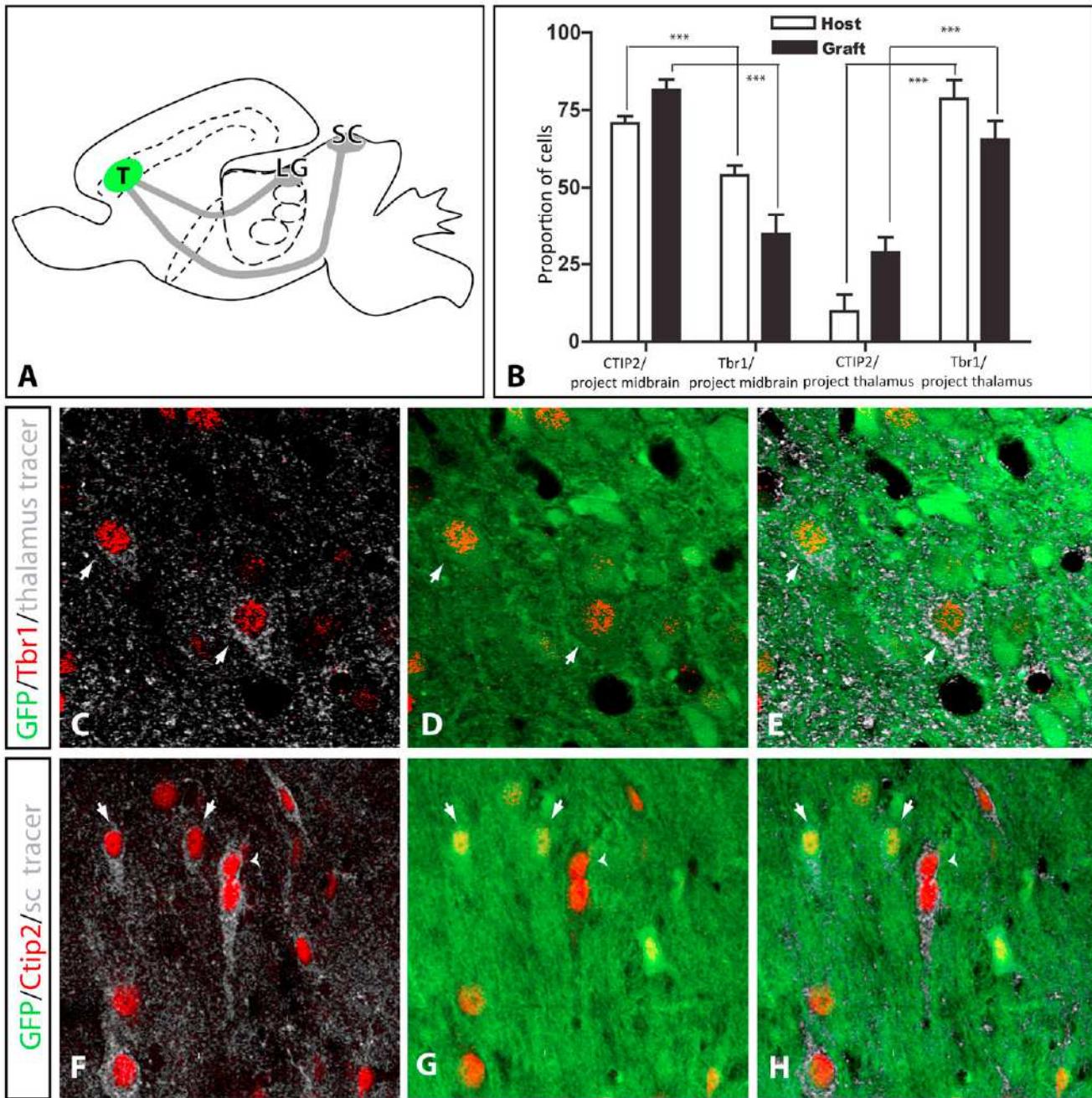


Figure 5. Human ESC-Derived Cortical Neurons Display Coordinated Patterns of Axonal Projections and Molecular Identity

(A) Cartoon depicting experiments of retrograde tracing injections in the thalamus (LG) or in the midbrain (SC). T, transplant.

(B) Quantification of the percentage of *Ctip2*- or *Tbr1*-positive host and grafted cells among all cells labeled with the midbrain or the thalamic retrograde tracer. ($n > 30$ cells). Values are expressed as the mean \pm SEP (z test, *** $p < 0.001$).

(C–E) Thalamic injection of a retrograde tracer labels *Tbr1* and GFP double-positive grafted hESC-derived neurons. Immunostaining of GFP (in green) (D and E), *Tbr1* (in red) (C and E), and the retrograde tracer (in gray) (C and E). Arrows show hESC-derived neurons positive for GFP/*Tbr1* and the retrograde tracer.

(F–H) Superior colliculus (midbrain) injection of a retrograde tracer labels *CTIP2* and GFP double-positive hESC-derived neurons. Immunostaining of GFP (in green) (G and H), *CTIP2* (in red) (F–H), and the retrograde tracer (in gray) (F and H). Arrows show hESC-derived neurons positive for GFP/*CTIP2* and the retrograde tracer; arrowhead shows a host-derived neuron, negative for GFP and positive for *CTIP2* and the retrograde tracer.

Our data constitute direct *in vivo* demonstration of cortical identity of neurons differentiated from human ESC. Most importantly, the robustness and extent of the process of integration

and differentiation of the grafted neurons reveals the possibility to combine human ESC/iPSC corticogenesis with xenografting for the *in vivo* modeling of human cortical diseases. This

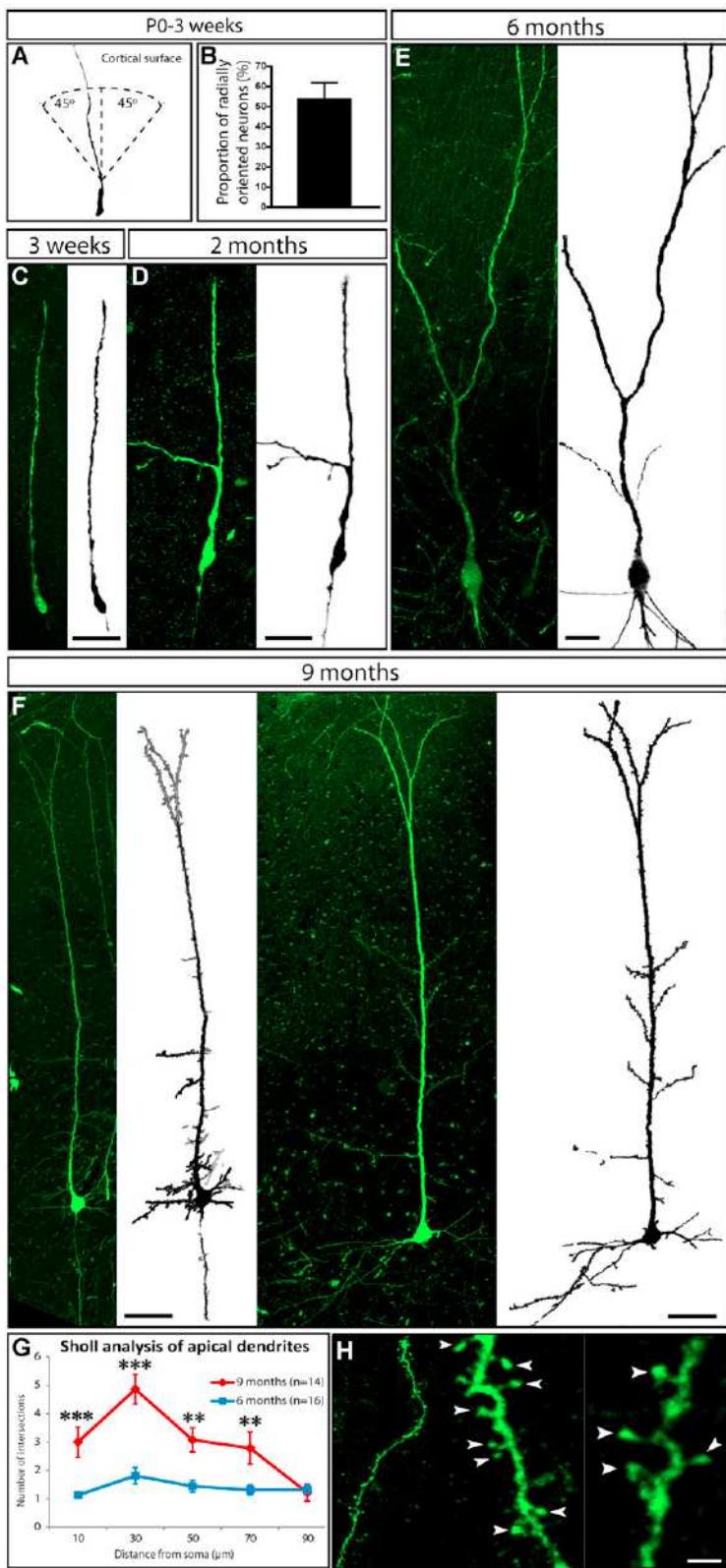


Figure 6. Human ESC-Derived Cortical Neurons Undergo Elaborate Dendritic Maturation after 9 Months Grafted In Vivo

(A) Camera lucida image representing a human ESC-derived neuron in the cortex extending its apical dendrite toward the cortical surface 3 weeks after grafting.

(B) Quantification of the percentage of neurons displaying an apical dendrite oriented toward the cortical surface after 3 weeks. Mean \pm SEM (n = 102 neurons).

(C–E) Representative confocal and camera lucida images of grafted human GFP-positive neurons with characteristic immature dendritic patterns 3 weeks and 2 and 6 months after grafting.

(F) Two examples of hESC-derived neurons (GFP-positive) displaying a more mature and elaborate dendritic pattern.

(G) Quantification of the Sholl analysis performed in apical dendrites of hESC-derived neurons after 6 and 9 months grafting. n = 16 for 6 months and n = 14 for 9 months. **p < 0.01, ***p < 0.001.

(H) GFP immunostaining revealing dendritic spines on grafted neurons. Scale bars represent 20 μm in (C–G) and 5 μm in (H).

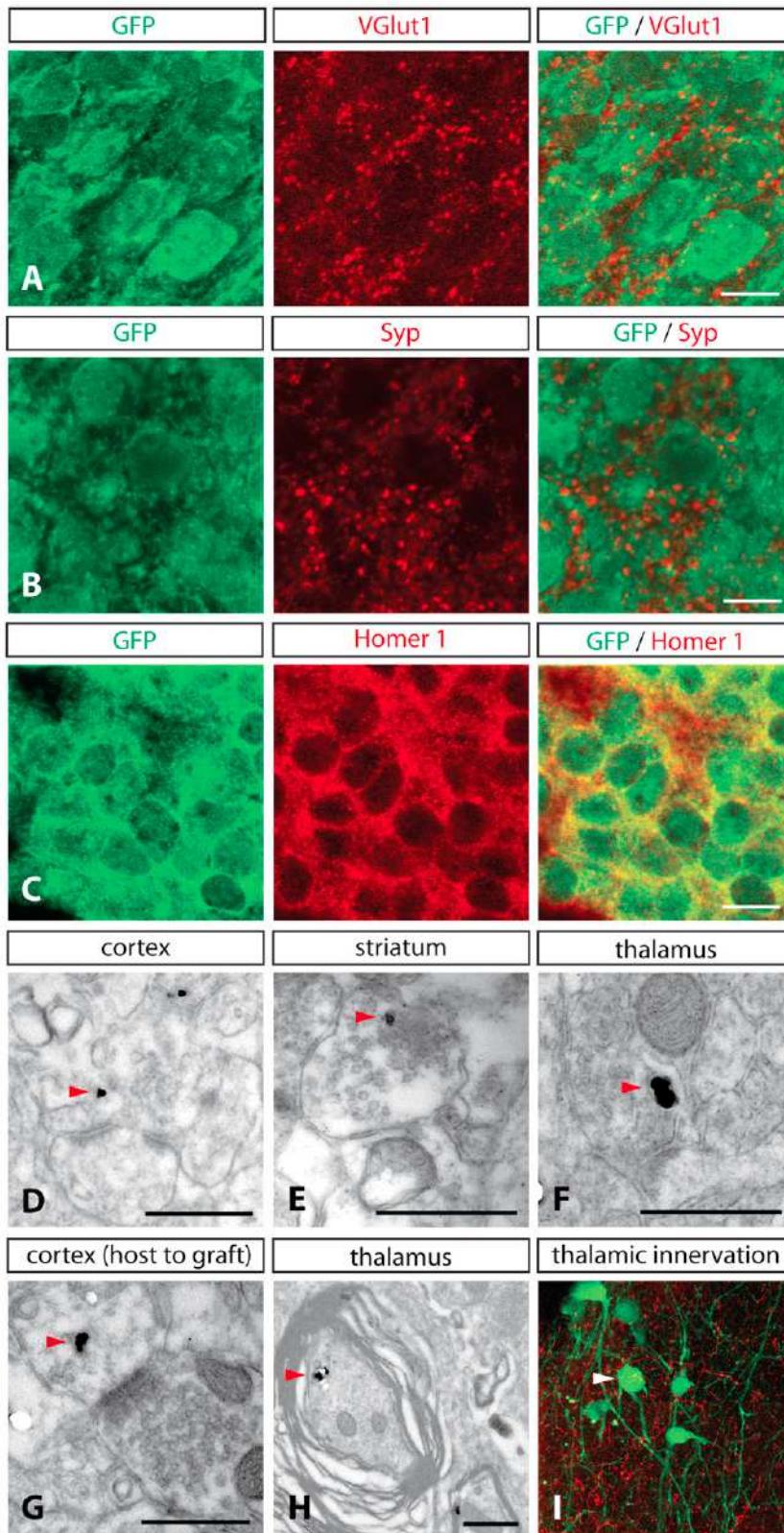


Figure 7. Grafted Human ESC-Derived Neurons Establish Reciprocal Synapses with the Host and Receive Thalamic Input

(A–C) Immunofluorescence images from 2-month-old grafts showing the expression of GFP (in green) and VGlut1 (in red) (A), synaptophysin (Syp) (in red) (B), and HOMER1 (in red) (C).

(D–F) Electron microscopy combined with GFP immunostaining (red arrowheads) of synaptic contacts from graft to host within the cortex (D), striatum (E), and thalamus (F), and from host to graft (G) 6 months after grafting.

(H) Electron microscopy image of GFP-positive myelinated fibers within the thalamus 6 months after grafting. Red arrowheads show GFP immunogold detection.

(I) Fibers positive for the anterograde tracer BDA (in red) were detected in close vicinity of GFP-positive grafted neurons (in green) after thalamic BDA injection 6 months after grafting. Scale bars represent 10 μm in (A–C) and 500 nm in (D–H).

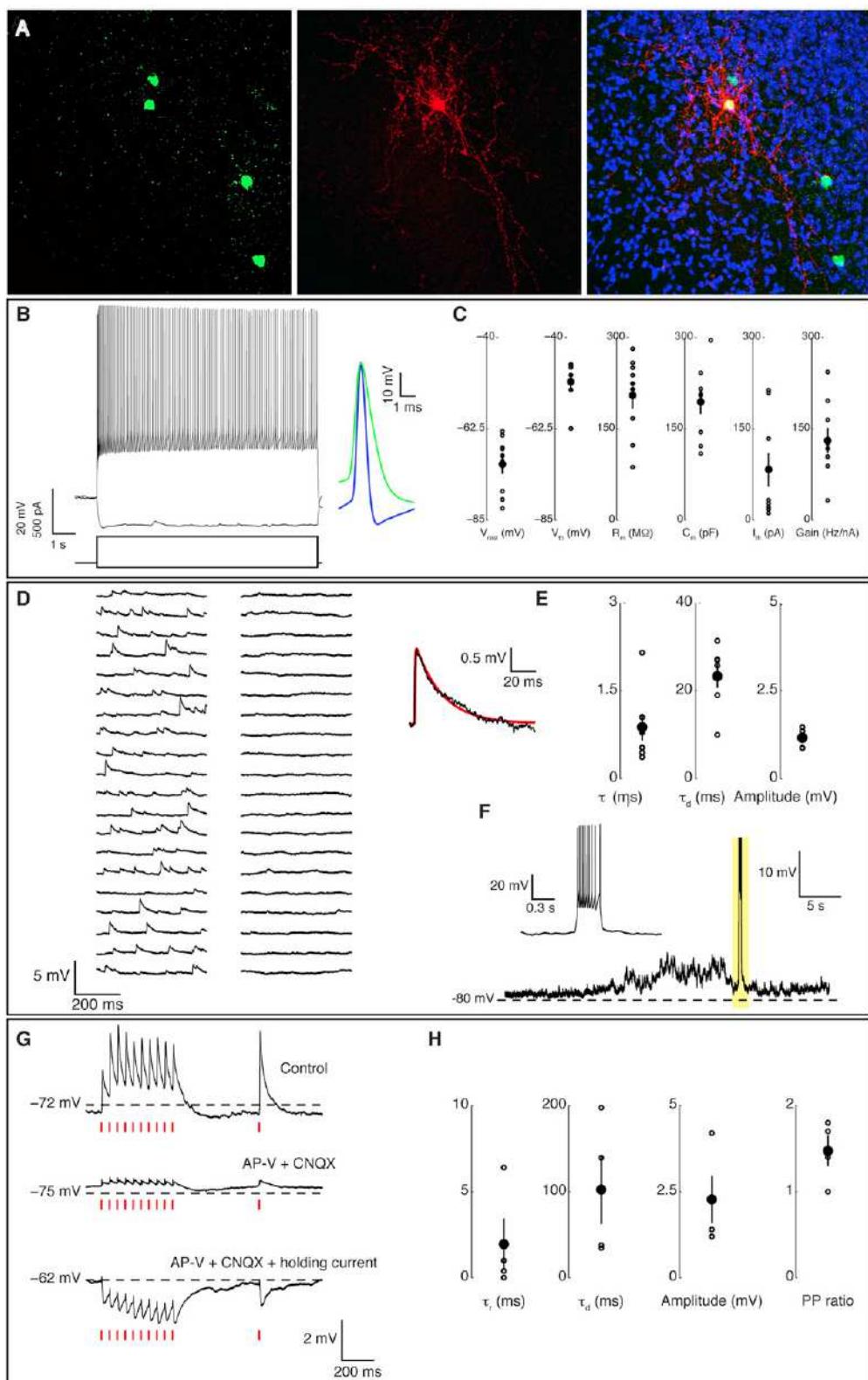


Figure 8. Grafted Human ESC-Derived Neurons Integrate Functionally in the Synaptic Microcircuitry of the Mouse Host Brain

(A) Immunofluorescence staining showing human GFP-positive neurons (in green) (left and right) integrated into the mouse cortex and stained for biocytin (in red, injected during patch-clamp recording) (middle and right) and Hoechst (in blue) (right).

(legend continued on next page)

approach could be particularly insightful to study neurodevelopmental conditions of genetic origin that affect complex patterns of morphology and connectivity of cortical neurons, and for which animal or purely *in vitro* models may be insufficient (Dolmetsch and Geschwind, 2011; Han et al., 2011; Marchetto et al., 2010; Zhang et al., 2010). In addition, it will be interesting to test whether and how ESC/iPSC-derived cortical cells could be used in cell therapy paradigms for lesions of the cerebral cortex in the adult brain, as previously shown for mouse embryonic cortical neurons (Gaillard et al., 2007).

Another striking aspect of ESC-derived corticogenesis relates to the links between cortical developmental timing and evolution. The protracted periods of human ESC-derived progenitor amplification and neuronal production are highly reminiscent of the extended period of human corticogenesis that allows the generation of a greater number of cortical neurons (Caviness et al., 1995; Lui et al., 2011; Rakic, 2009). ESC-derived intrinsic corticogenesis will thus enable the properties of mouse and human cortical progenitors that underlie their species-specific neurogenic potential to be directly compared (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010). Similarly, the mechanisms underlying the slow rate of maturation of human ESC cortical neurons, including dendritic and axonal outgrowth and synaptogenesis, could provide hints on the origin of the neoteny that is thought to characterize human cortical synaptogenesis and plasticity (Defelipe, 2011; Petanjek et al., 2011). Comparison of nonhuman and human ESC-derived corticogenesis could also be used to study the growing number of genes displaying human-specific signatures of evolution in the context of brain development (Johnson et al., 2009; Lambert et al., 2011; Pollard et al., 2006; Sudmant et al., 2010).

The combination of human genetics, comparative genomics, and embryology, together with pluripotent stem cell-derived corticogenesis and xenografting, may thus pave the way to the elucidation of the mechanisms underlying the generation of the most complex structure in our brain and some of its most severe pathologies.

(B) Sample raw voltage trace of a cell, in response to hyperpolarizing and depolarizing current steps: the firing response is reminiscent of a regular firing accommodating-type cell. The bottom inset shows the first (blue) and the last (green) spike, while the top inset shows the temporal evolution of the instantaneous firing rate.

(C) Single-cell properties: open circles indicate values from single experiments ($n = 9$), filled circles represent the population mean, and error bars show SEM. Resting membrane potentials V_{rest} , AP firing thresholds V_{th} , input resistances R_m , membrane capacitances C_m , rheobase currents I_{th} , and the slope (gain) of the frequency-current curve represent typical signatures of cortical neurons passive and active electrical properties.

(D) Sample raw voltage traces before (left) and after (right) the bath application of ionotropic glutamatergic receptors antagonists (i.e., CNQX and AP-V).

(E) Spontaneous postsynaptic potential (PSP) properties, extracted by fitting each spontaneous event with a double exponential function: open circles indicate values obtained from distinct ESC-derived neurons ($n = 7$), filled circles represent the population mean, and error bars show the SEM. The rise time τ_r , decay time τ_d , and the maximal PSP amplitudes represent typical signatures of the activation of proximal AMPA receptor (AMPAR)-mediated glutamatergic synapses. The inset shows a representative single PSP waveform (black) and its fit (red).

(F) Episodic occurrence of increase in background synaptic activity and interictal-like firing: increase in synchronous spontaneous PSPs induces strong voltage fluctuations and a transient membrane depolarization, ultimately leading to the firing of several APs (truncated to allow an expanded view of subthreshold voltage fluctuations). The inset shows a zoom of the area highlighted in yellow.

(G) Sample raw voltage traces, in response to a train of 11 extracellular electrical stimuli at 20 Hz (timed by the red dashes). The top trace quantifies the evoked response under control artificial cerebrospinal fluid. The subsequent application of selective competitive antagonist of AMPAR and NMDAR (i.e., CNQX and AP-V) blocks glutamatergic responses, significantly suppressing evoked PSPs (central trace). The residual responses were GABA_AR-mediated, as demonstrated by the successful reversal of the PSP amplitudes, upon injection of a positive holding current (i.e., from -75 mV to -62 mV that is more depolarized than the Chloride reversal potential).

(H) Evoked PSP properties: open circles indicate values from single experiments ($n = 4$), filled circles represent the population mean, and error bars show SEM. Rise time τ_r , decay time τ_d , the maximal PSP amplitude, and the paired-pulse amplitude ratio represent typical signatures of the activation of short-term facilitating compound glutamatergic and GABAergic microcircuit afferents.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

ESC/iPSC Differentiation into Cortical Cells

For the differentiation, on day -2, cells were dissociated using Stem-Pro Accutase (Invitrogen A11105) and plated on matrigel (BD, hES qualified matrigel) or on poly-Lysine (BD 354210 33.3 mg/ml)/Laminin (BD 354232 3.3 mg/ml) coated-coverslips/dishes at low confluence (5,000–10,000 cells/cm²) in MEF-conditioned hES/hiPS medium supplemented with ROCK inhibitor (Y-27632; 10 μM Calbiochem, 688000). When testing cell culture substrates, we found that poly-Lysine/Laminin and Matrigel both resulted in a similar degree of cortical specification, but the latter was used preferentially in the subsequent experiments as it improved cell adhesion considerably. On day 0 of the differentiation, the medium was changed to DDM (Gaspard et al., 2009), supplemented with B27 (10 ml B27 per 500 ml DDM, to increase survival) and Noggin (100 ng/ml), and the medium was replenished every 2 days. After 16 DIV, the medium was changed to DDM, supplemented with B27, and changed every 2 days. At 24 DIV, the progenitors were manually dissociated and cells were resuspended in DDM supplemented with B27 and ROCK inhibitor (10 μM) and plated onto poly-Lysine/Laminin-coated coverslips. Five to seven days after dissociation, half of the medium was replenished with Neurobasal supplemented with B27 (10 ml B27 per 500 ml DDM) and 2 mM glutamine and changed again every 5–7 days. For experiments comparing mouse and human ESC differentiation, cyclopamine was also added at 2–10 DIV.

Intracerebral Grafting

Grafting experiments in newborn mouse motor cortex were performed as previously described (Gaspard et al., 2008), using CD1 (for analysis at 1 month) and NOD/SCID mice (for analysis at 2, 6, and 9 months, as immunosuppression was mandatory to achieve integration beyond 2 months). Human ESC-derived progenitors and neurons were manually dissociated at day 24 in culture supplemented with ROCK inhibitor (10 μM). About 100,000–200,000 cells were injected. Analyses on each time point after transplantation were performed on two independent transplantation procedures using three different sets of *in vitro* differentiations, which yielded similar results. A total number of 34 cases were analyzed ($n = 10$ for 1 month, 12 for 2 months, 6 for 6 months, and 6 for 9–10 months).

Axonal Tracing

Thalamic input to the graft and grafted neurons projecting to the thalamus were traced with biotin dextran amine (BDA; 10,000 molecular weight; Molecular Probes) and applied iontophoretically into the ipsilateral dorsal lateral geniculate nucleus (DLG).

Grafted neurons projecting to the superior colliculus were traced with Alexa Fluor 568-conjugated Dextran (0.5 µl, 1% in distilled water; Molecular Probes) injected into the ipsilateral superior colliculus (SC).

Calcium Imaging

For calcium dye loading, each coverslip was incubated with Oregon Green BAPTA 1-AM. Imaging was carried out using an Axioskop 2 microscope (Zeiss) equipped with a charge-coupled device camera (iXon +, Andor Technology). For pharmacological experiment, TTX (1 µM) was applied by superfusion.

In Vitro Electrophysiology

Whole-cell patch-clamp recordings were performed on individual neurons identified by using infrared differential interference contrast microscopy (Axioskop 2FS, 63×/0.95w, Zeiss). For temporal analysis of functional maturation, 127 cells were recorded from days of differentiation 38 to 82. Cells were classified in two groups as a function of time: early (days 38–65) and late (days 68–82) time points.

Ex Vivo Electrophysiology

Electrophysiology recordings were performed on grafted neurons in acute brain slices from mice at 10 months posttransplantation. Transplanted cells were identified by their enhanced GFP (EGFP) fluorescence and visualized using an upright microscope equipped with infrared differential interference contrast (Leica Microsystems, DMLFS). Some neurons were filled with biocytin during the recordings and were later fixed and stained with streptavidin fluorophore conjugates (see *Supplemental Experimental Procedures*) for subsequent identification and reconstruction of cell morphology. Whole-cell patch-clamp recordings (EPC 10, HEKA Amplifier Electronics) and bipolar extracellular stimulation (ISO-Flex, AMPI) were performed as described in more detail in the *Supplemental Experimental Procedures*.

Transcriptome Analyses

Total RNA from two independent samples from ESC-derived cortical differentiations and from fetal cortex samples was extracted using standard procedures (Lambert et al., 2011), and the corresponding cDNAs were prepared and hybridized according to manufacturer's instructions (Affymetrix HGU133+V2.0).

Human Embryonic/Fetal Cortical Samples

The study was approved by the three relevant Ethics Committees (Erasmus Hospital, Université Libre de Bruxelles, and Belgian National Fund for Scientific Research FRS/FNRS) on research involving human subjects. Written informed consent was given by the parents in each case.

Additional Methods

An extended version of the experimental procedures is described online in the *Supplemental Experimental Procedures*.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes nine figures, three tables, *Supplemental Experimental Procedures*, and one movie and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.011>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gilbert Vassart for continuous support and interest, members of the laboratory and IRIBHM for helpful discussions and advice, Viviane De Maertelaer for advice on statistical analyses, Frédéric Bollet-Quivogne (FNRS Logistic Scientist) of the Light Microscopy Facility (LIMIF) for his support with imaging, Marie-Alexandra Lambot for help in the preparation of the human fetal samples, E. Bére for advice on electron microscopy, Delphine Potier and Stein Aerts for their help with microarray data analyses, and Catherine Verfaillie and members of her laboratory for advice on iPSC generation. This work was funded by grants from the Belgian FNRS and FRSM, the Belgian Queen Elisabeth Medical Foundation, the Action de Recherches Concertées (ARC)

Programs, the Interuniversity Attraction Poles Program (IUAP) initiated by the Belgian Science Policy Office, the Welbio and Programme d'Excellence CIBLES of the Walloon Region, the Fondations ULB, Pierre Clerdent and Roger de Spoelberch (to P.V.), and the Agence Nationale de la Recherche (grant N°ANR-09-MNPS-027-01, to A.G.). M.G. and D.L. are supported by the European Commission (7th Framework Programme, MATERA+ Programme) University of Antwerp (NOI-BOF2009), the Flemish agency for Innovation by Science and Technology (grant 90455/1955, <http://www.iwt.be>), and the Flanders Research Foundation (grant 12C9112N, <http://www.fwo.be>). P.V. is Research Director, I.E-C. is Postdoctoral Fellow, and is N.L. clinical scientist of the FNRS.

Accepted: December 3, 2012

Published: February 6, 2013

REFERENCES

- Alcamo, E.A., Chirivella, L., Dautzenberg, M., Dobreva, G., Fariñas, I., Grosschedl, R., and McConnell, S.K. (2008). Satb2 regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Neuron* 57, 364–377.
- Barnes, A.P., and Polleux, F. (2009). Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 347–381.
- Bedogni, F., Hodge, R.D., Elsen, G.E., Nelson, B.R., Daza, R.A., Beyer, R.P., Bammler, T.K., Rubenstein, J.L., and Hevner, R.F. (2010). Tbr1 regulates regional and laminar identity of postmitotic neurons in developing neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 13129–13134.
- Bystron, I., Rakic, P., Molnár, Z., and Blakemore, C. (2006). The first neurons of the human cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* 9, 880–886.
- Bystron, I., Blakemore, C., and Rakic, P. (2008). Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 110–122.
- Caviness, V.S., Jr., Takahashi, T., and Nowakowski, R.S. (1995). Numbers, time and neocortical neurogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci.* 18, 379–383.
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* 27, 275–280.
- Defelipe, J. (2011). The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. *Front Neuroanat* 5, 29.
- Dolmetsch, R., and Geschwind, D.H. (2011). The human brain in a dish: the promise of iPSC-derived neurons. *Cell* 145, 831–834.
- Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takahashi, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., Wataya, T., Nishiyama, A., Muguruma, K., and Sasai, Y. (2008). Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* 3, 519–532.
- Fietz, S.A., Kelava, I., Vogt, J., Wilsch-Bräuninger, M., Stenzel, D., Fish, J.L., Corbeil, D., Riehn, A., Distler, W., Nitsch, R., and Huttner, W.B. (2010). OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat. Neurosci.* 13, 690–699.
- Fish, J.L., Dehay, C., Kennedy, H., and Huttner, W.B. (2008). Making bigger brains—the evolution of neural-progenitor-cell division. *J. Cell Sci.* 121, 2783–2793.
- Gaillard, A., Gaillard, F., and Roger, M. (1998). Neocortical grafting to newborn and adult rats: developmental, anatomical and functional aspects. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 148, 1–86.
- Gaillard, A., Prestoz, L., Dumartin, B., Cantereau, A., Morel, F., Roger, M., and Jaber, M. (2007). Reestablishment of damaged adult motor pathways by grafted embryonic cortical neurons. *Nat. Neurosci.* 10, 1294–1299.
- Gaspard, N., and Vanderhaeghen, P. (2011). Laminar fate specification in the cerebral cortex. *F1000 Biol. Rep.* 3, 6.
- Gaspard, N., Bouschet, T., Hourez, R., Dimidschstein, J., Naeije, G., van den Ameele, J., Espuny-Camacho, I., Herpoel, A., Passante, L., Schiffmann, S.N., et al. (2008). An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature* 455, 351–357.

- Gaspard, N., Bouschet, T., Herpoel, A., Naeije, G., van den Ameele, J., and Vanderhaeghen, P. (2009). Generation of cortical neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Protoc.* 4, 1454–1463.
- Han, S.S., Williams, L.A., and Eggan, K.C. (2011). Constructing and deconstructing stem cell models of neurological disease. *Neuron* 70, 626–644.
- Hand, R., Bortone, D., Mattar, P., Nguyen, L., Heng, J.I., Guerrier, S., Boutt, E., Peters, E., Barnes, A.P., Parras, C., et al. (2005). Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* 48, 45–62.
- Hansen, D.V., Lui, J.H., Parker, P.R., and Kriegstein, A.R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 464, 554–561.
- Hansen, D.V., Rubenstein, J.L., and Kriegstein, A.R. (2011). Deriving excitatory neurons of the neocortex from pluripotent stem cells. *Neuron* 70, 645–660.
- Hébert, J.M., and Fishell, G. (2008). The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 678–685.
- Hevner, R.F. (2006). From radial glia to pyramidal-projection neuron: transcription factor cascades in cerebral cortex development. *Mol. Neurobiol.* 33, 33–50.
- Hill, R.S., and Walsh, C.A. (2005). Molecular insights into human brain evolution. *Nature* 437, 64–67.
- Ideguchi, M., Palmer, T.D., Recht, L.D., and Weimann, J.M. (2010). Murine embryonic stem cell-derived pyramidal neurons integrate into the cerebral cortex and appropriately project axons to subcortical targets. *J. Neurosci.* 30, 894–904.
- Inoue, T., Nakamura, S., and Osumi, N. (2000). Fate mapping of the mouse prosencephalic neural plate. *Dev. Biol.* 219, 373–383.
- Johnson, M.B., Kawasawa, Y.I., Mason, C.E., Krnsik, Z., Coppola, G., Bogdanović, D., Geschwind, D.H., Mane, S.M., State, M.W., and Sestan, N. (2009). Functional and evolutionary insights into human brain development through global transcriptome analysis. *Neuron* 62, 494–509.
- Lambert, N., Lambot, M.A., Bilheu, A., Albert, V., Englert, Y., Libert, F., Noel, J.C., Sotiriou, C., Holloway, A.K., Pollard, K.S., et al. (2011). Genes expressed in specific areas of the human fetal cerebral cortex display distinct patterns of evolution. *PLoS ONE* 6, e17753.
- Leone, D.P., Srinivasan, K., Chen, B., Alcamo, E., and McConnell, S.K. (2008). The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 28–35.
- Li, X.J., Zhang, X., Johnson, M.A., Wang, Z.B., Lavaute, T., and Zhang, S.C. (2009). Coordination of sonic hedgehog and Wnt signaling determines ventral and dorsal telencephalic neuron types from human embryonic stem cells. *Development* 136, 4055–4063.
- Lui, J.H., Hansen, D.V., and Kriegstein, A.R. (2011). Development and evolution of the human neocortex. *Cell* 146, 18–36.
- Marchetto, M.C., Winner, B., and Gage, F.H. (2010). Pluripotent stem cells in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. *Hum. Mol. Genet.* 19(R1), R71–R76.
- McCormick, D.A., Connors, B.W., Lighthall, J.W., and Prince, D.A. (1985). Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J. Neurophysiol.* 54, 782–806.
- McKenna, W.L., Betancourt, J., Larkin, K.A., Abrams, B., Guo, C., Rubenstein, J.L., and Chen, B. (2011). *Tbr1* and *Fezf2* regulate alternate corticofugal neuronal identities during neocortical development. *J. Neurosci.* 31, 549–564.
- Molnár, Z., and Cheung, A.F. (2006). Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neurosci. Res.* 55, 105–115.
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R., and Macklis, J.D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 427–437.
- O’Leary, D.D., and Sahara, S. (2008). Genetic regulation of arealization of the neocortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 90–100.
- Okano, H., and Temple, S. (2009). Cell types to order: temporal specification of CNS stem cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 112–119.
- Paxinos, G.F., and Franklin, K.B.J. (1997). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (San Diego, CA: Academic Press).
- Pera, M.F., Andrade, J., Houssami, S., Reubinoff, B., Trounson, A., Stanley, E.G., Ward-van Oostwaard, D., and Mummery, C. (2004). Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. *J. Cell Sci.* 117, 1269–1280.
- Petanjek, Z., Judaš, M., Šimic, G., Rasin, M.R., Uylings, H.B., Rakic, P., and Kostovic, I. (2011). Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 13281–13286.
- Pinaudeau, C., Gaillard, A., and Roger, M. (2000). Stage of specification of the spinal cord and tectal projections from cortical grafts. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2486–2496.
- Pollard, K.S., Salama, S.R., Lambert, N., Lambot, M.A., Coppens, S., Pedersen, J.S., Katzman, S., King, B., Onodera, C., Siepel, A., et al. (2006). An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. *Nature* 443, 167–172.
- Rakic, P. (1995). A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci.* 18, 383–388.
- Rakic, P. (2009). Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 724–735.
- Reyes, A., and Sakmann, B. (1999). Developmental switch in the short-term modification of unitary EPSPs evoked in layer 2/3 and layer 5 pyramidal neurons of rat neocortex. *J. Neurosci.* 19, 3827–3835.
- Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., Robinson, H.P., and Livesey, F.J. (2012). Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat. Neurosci.* 15, 477–486, S1.
- Sudmant, P.H., Kitzman, J.O., Antonacci, F., Alkan, C., Malig, M., Tselenko, A., Sampas, N., Bruhn, L., Shendure, J., and Eichler, E.E.; 1000 Genomes Project. (2010). Diversity of human copy number variation and multicopy genes. *Science* 330, 641–646.
- Sur, M., and Rubenstein, J.L. (2005). Patterning and plasticity of the cerebral cortex. *Science* 310, 805–810.
- Vanderhaeghen, P., and Polleux, F. (2004). Developmental mechanisms patterning thalamocortical projections: intrinsic, extrinsic and in between. *Trends Neurosci.* 27, 384–391.
- Walther, C., and Gruss, P. (1991). Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113, 1435–1449.
- Wang, Y., Markram, H., Goodman, P.H., Berger, T.K., Ma, J., and Goldman-Rakic, P.S. (2006). Heterogeneity in the pyramidal network of the medial prefrontal cortex. *Nat. Neurosci.* 9, 534–542.
- Wilson, S.W., and Houart, C. (2004). Early steps in the development of the forebrain. *Dev. Cell* 6, 167–181.
- Zeng, H., Guo, M., Martins-Taylor, K., Wang, X., Zhang, Z., Park, J.W., Zhan, S., Kronenberg, M.S., Lichter, A., Liu, H.X., et al. (2010). Specification of region-specific neurons including forebrain glutamatergic neurons from human induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 5, e11853.
- Zhang, X., Huang, C.T., Chen, J., Pankratz, M.T., Xi, J., Li, J., Yang, Y., Lavaute, T.M., Li, X.J., Ayala, M., et al. (2010). Pax6 is a human neuroectoderm cell fate determinant. *Cell Stem Cell* 7, 90–100.

Neuron, Volume 77

Supplemental Information

**Pyramidal Neurons Derived from Human
Pluripotent Stem Cells Integrate Efficiently
into Mouse Brain Circuits In Vivo**

**Ira Espuny-Camacho, Kimmo A. Michelsen, David Gall, Daniele Linaro, Anja Hasche,
Jérôme Bonnefont, Camilia Bali, David Orduz, Angéline Bilheu, Adèle Herpoel, Nelle
Lambert, Nicolas Gaspard, Sophie Péron, Serge N. Schiffmann, Michele Giugliano,
Afsaneh Gaillard, and Pierre Vanderhaeghen**

Figure S1. Related to Figure 1

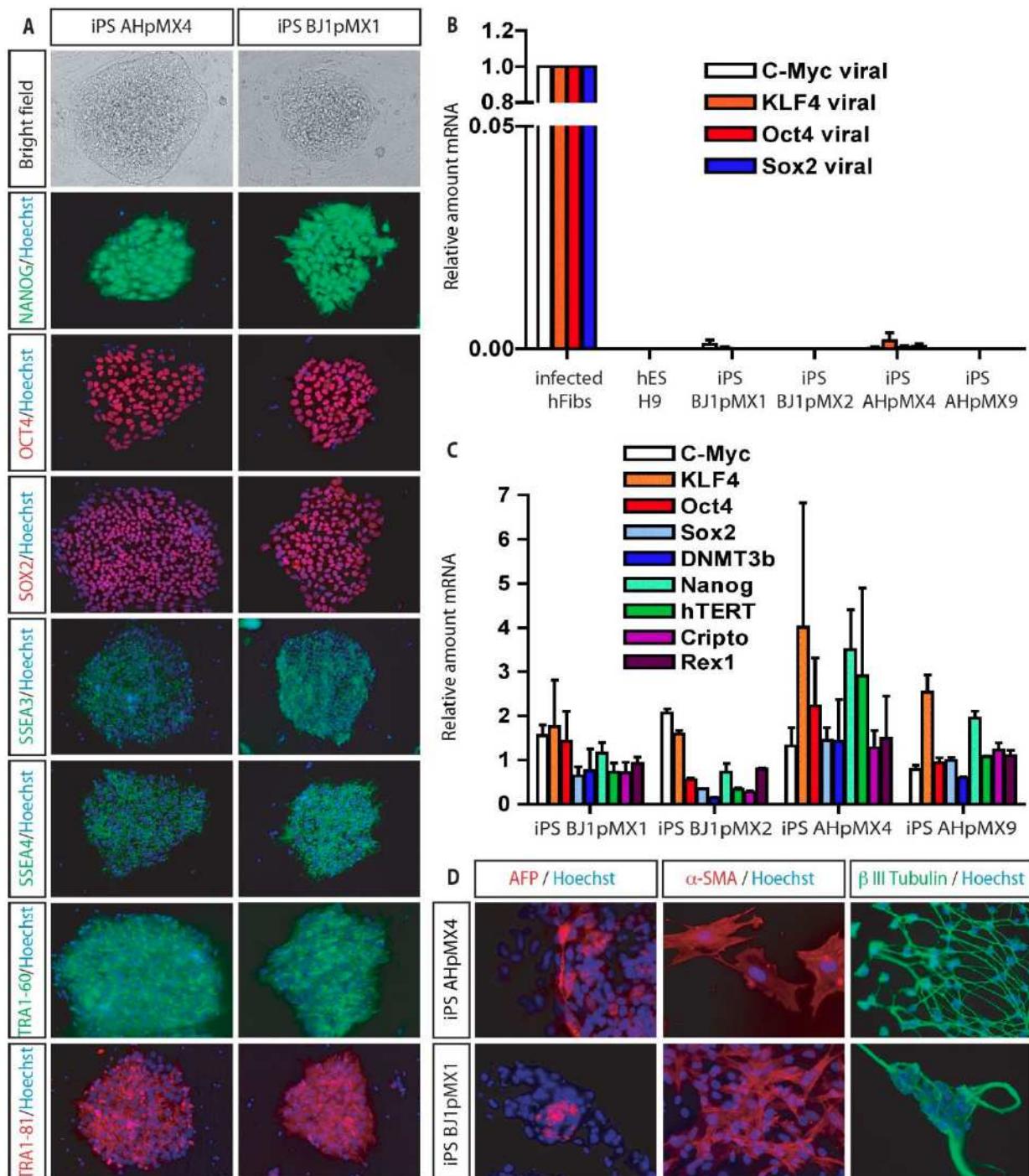


Figure S1. iPS cell line characterization.

(A) Bright field and immunofluorescence images from AHpMX4 and BJ1pMX1 iPS cell lines showing Nanog (in green), Oct4 (in red), Sox2 (in red), SSEA3 (in green), SSEA4 (in green), TRA1-60 (in green), TRA1-81 (in red) and Hoechst (in blue) staining. (B) qRT-PCR comparing the levels of expression of the four viral constructs used for reprogramming between infected fibroblasts, two independently generated clones of each iPS cell line and H9 cells. Data are shown as relative amount of mRNA compared to the values of infected hFibs as value 1 +/- SEM (fold change). (N=2-3). (C) qRT-PCR showing the expression of pluripotent genes in two clones of BJ1pMX and AhpMX iPS cell lines. Data are shown as relative amount of mRNA compared to the values of H9 as value 1 +/- SEM (fold change). (N=2-3). (D) Immunofluorescence images of embryoid bodies generated from AHpMX4 and BJ1pMX1 iPS cell lines, showing positive cells for alpha fetoprotein (AFP) (marker for endoderm), alpha smooth muscle actin (α -SMA) (marker for mesoderm), and β III tubulin (marker for ectoderm).

Figure S2. Related to Figure 1

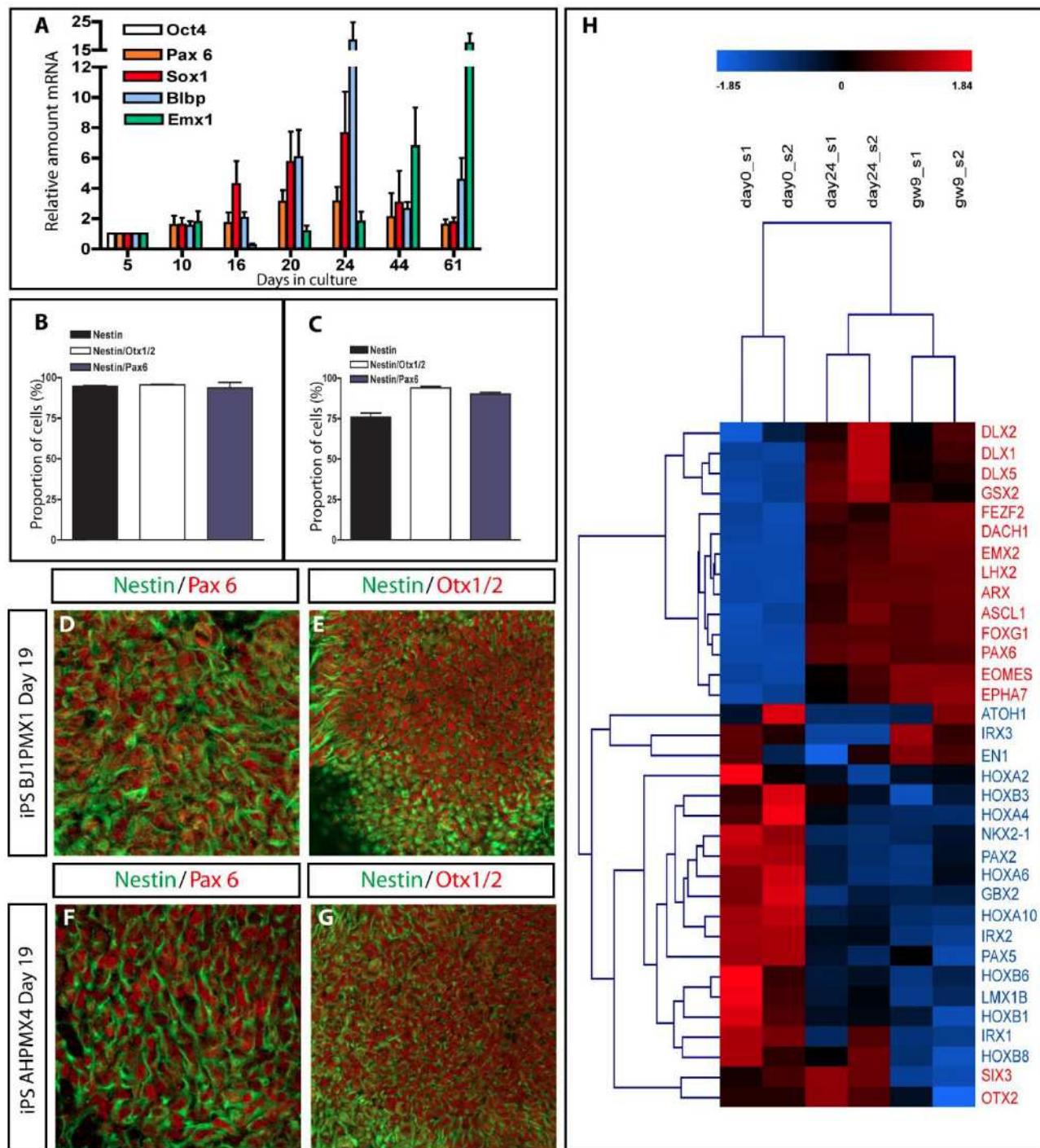


Figure S2. Default induction of rostro-dorsal cortical primordium from human ESC/iPSC.

(A) qRT-PCR analysis of human ESC-derived neural progenitors in culture. Data are shown as relative amount of mRNA compared to the values at day 5 of differentiation, as value 1 +/- SEM (fold change) (N=2-7). (B) Proportion of cells expressing Nestin among all cells, Otx1/2 and Pax6 among Nestin cells, after 19 days of differentiation from H9 cells. Mean +/- SEM (N=3). (C) Quantification from 2-3 different experiments of the proportion of Nestin, Nestin/Otx1/2 and Nestin/Pax6 positive cells at day 15-19 from BJ1pMX1 and AHpMX4 cell line. Representative immunofluorescence images of day 19 cultures for the expression of Nestin/Pax6 (D,F) and Nestin/Otx1/2 (E,G) from BJ1pMX1 (D-E) and AHpMX4 (F-G) iPS cell lines. (H) Heatmap showing the normalized rostro/caudal, dorso/ventral pattern of expression of day 24 differentiated cells compared to undifferentiated cells and human embryonic cortex at 9 gestational weeks (9 gw). 2 independent samples are analysed for each condition. (Above) Legend showing colour code for comparative levels of expression. Letter colour code: Red for genes present in rostral forebrain/cortical identity. Blue for genes enriched in caudal regions of CNS.

Figure S3. Related to Figure 1

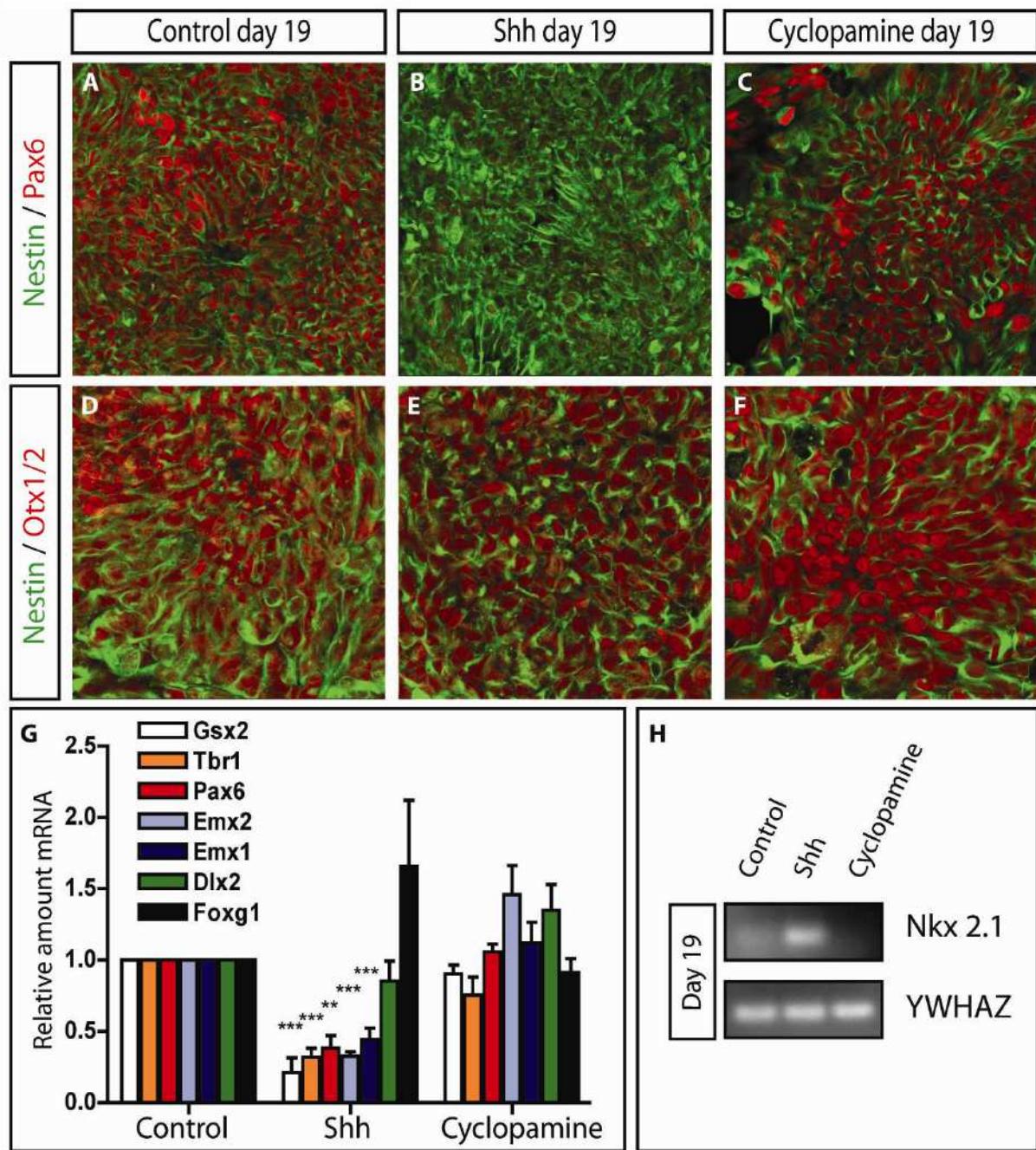


Figure S3. Dependence of human ESC forebrain differentiation to morphogenic cues.

(A-C) Representative immunofluorescence images for the expression of Nestin/Pax6 in control (A), Shh (B) and cyclopamine-treated conditions (C). (D-F) Representative immunofluorescence images for the expression of Nestin/Otx1/2 in control (D), Shh (E) and cyclopamine-treated conditions (F). (G) qRT-PCR analysis of the ESC-derived progenitors at day 19 for control, Shh or cyclopamine-treated conditions. Data are shown as relative amount of mRNA compared to the values of control condition as value 1 +/- SEM (fold change) (N=4-5). (H) RT-PCR product from human ESC-derived progenitors at day 19 for control, Shh or cyclopamine-treated conditions for Nkx2.1 (upper panel) and YWHAZ housekeeping gene (lower panel).

Figure S4. Related to Figure 1

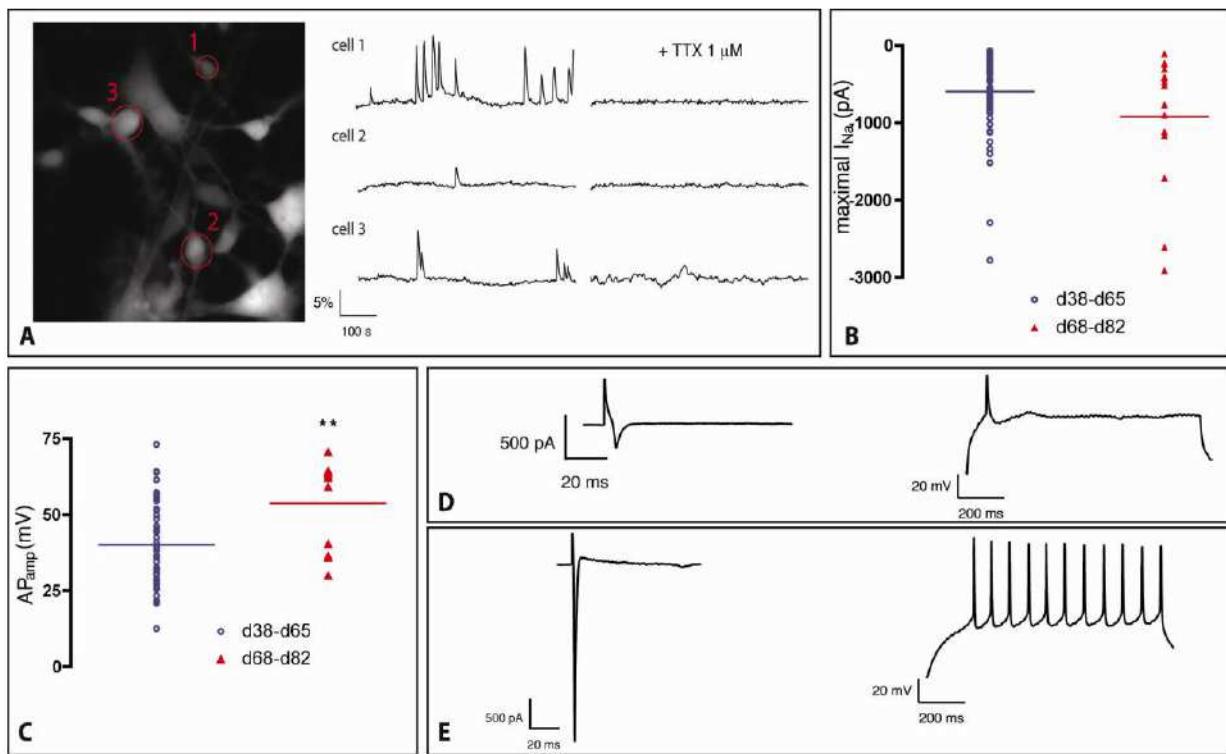


Figure S4. In vitro electrophysiological properties of human ESC-derived neurons at early and late time stages in culture.

(A) Calcium imaging of ESC-derived neurons after 53 days of differentiation. (Left) Fluorescence image of cells loaded with Oregon green 488 BAPTA 1. (Right) Representative traces showing spontaneous calcium spikes in individual neurons, that are suppressed by 1 μ M TTX. (B-C) Maximal intensity of the voltage dependent Na current (pA) and AP amplitude (mV) values at early and late stages in culture. Data are shown as single values (d38-d65 stage N=51-61, d68-d82 N=11-15) and the mean (Ttest ** p<0.01). (D) Representative traces of Na currents (left) and induced AP (right) from immature cells. (E) Representative traces of mature Na currents (left) and induced repetitive AP (right) from mature cells.

Figure S5. Related to Figure 2

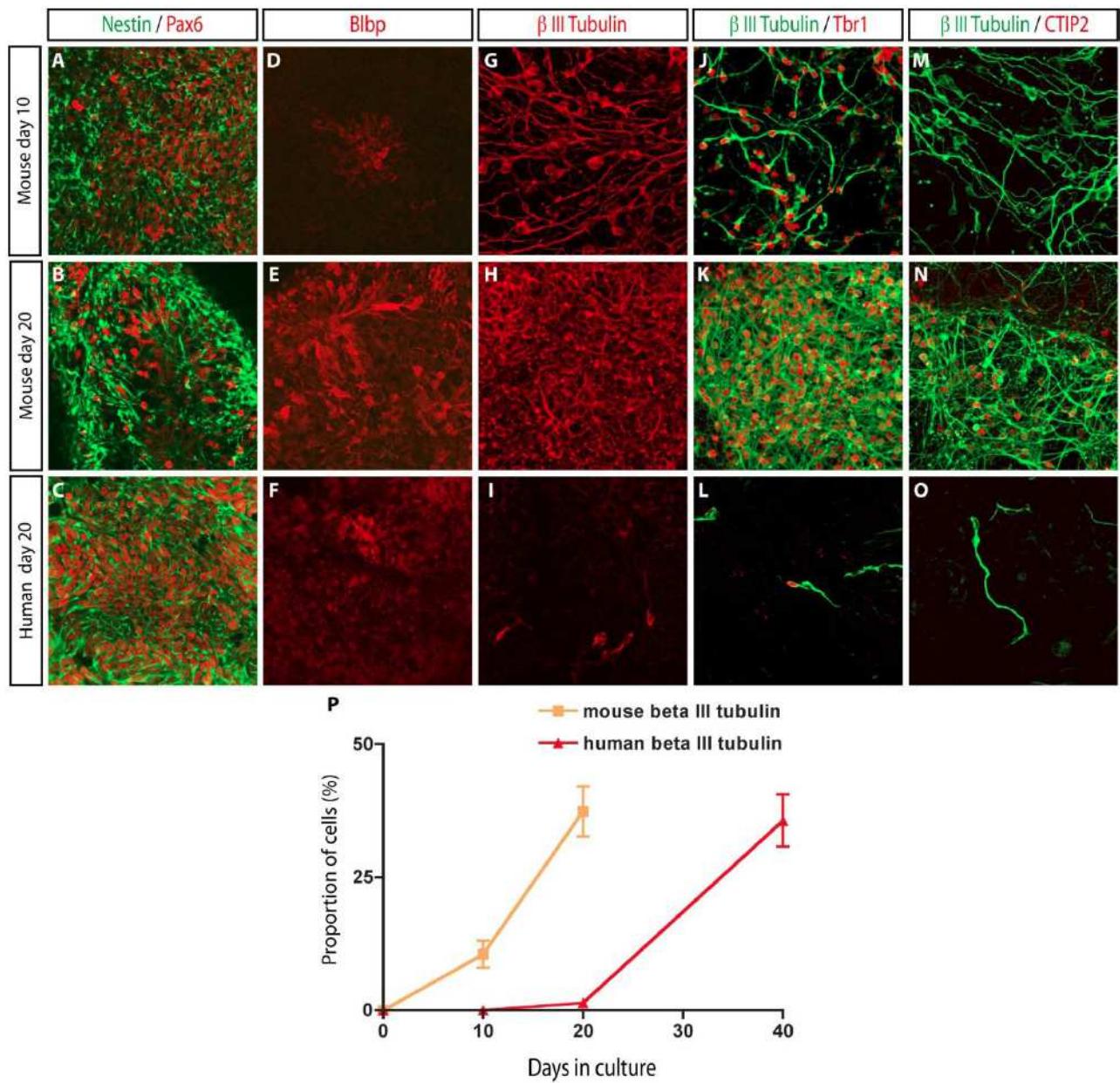


Figure S5. Species-specific temporal patterning of corticogenesis from mouse vs. human ESC.

Immunofluorescence stainings for Nestin (green) / Pax6 (red) (A-C), Blbp (red) (D-F), β III-tubulin (red) (G-I), β III-tubulin (green) / Tbr1 (red) (J-L) and β III-tubulin (green) / CTIP2 (red) (M-O), from mouse (A-B, D-E, G-H, J-K, M-N) and human (C,F,I,L,O) after 10 or 20 days of differentiation. (P) Quantification of β III-tubulin positive cells from mouse and human ESC-derived cultures after 10, 20 and 40 days of differentiation. Mean +/- SEM (N=2-3).

Figure S6. Related to Figure 2

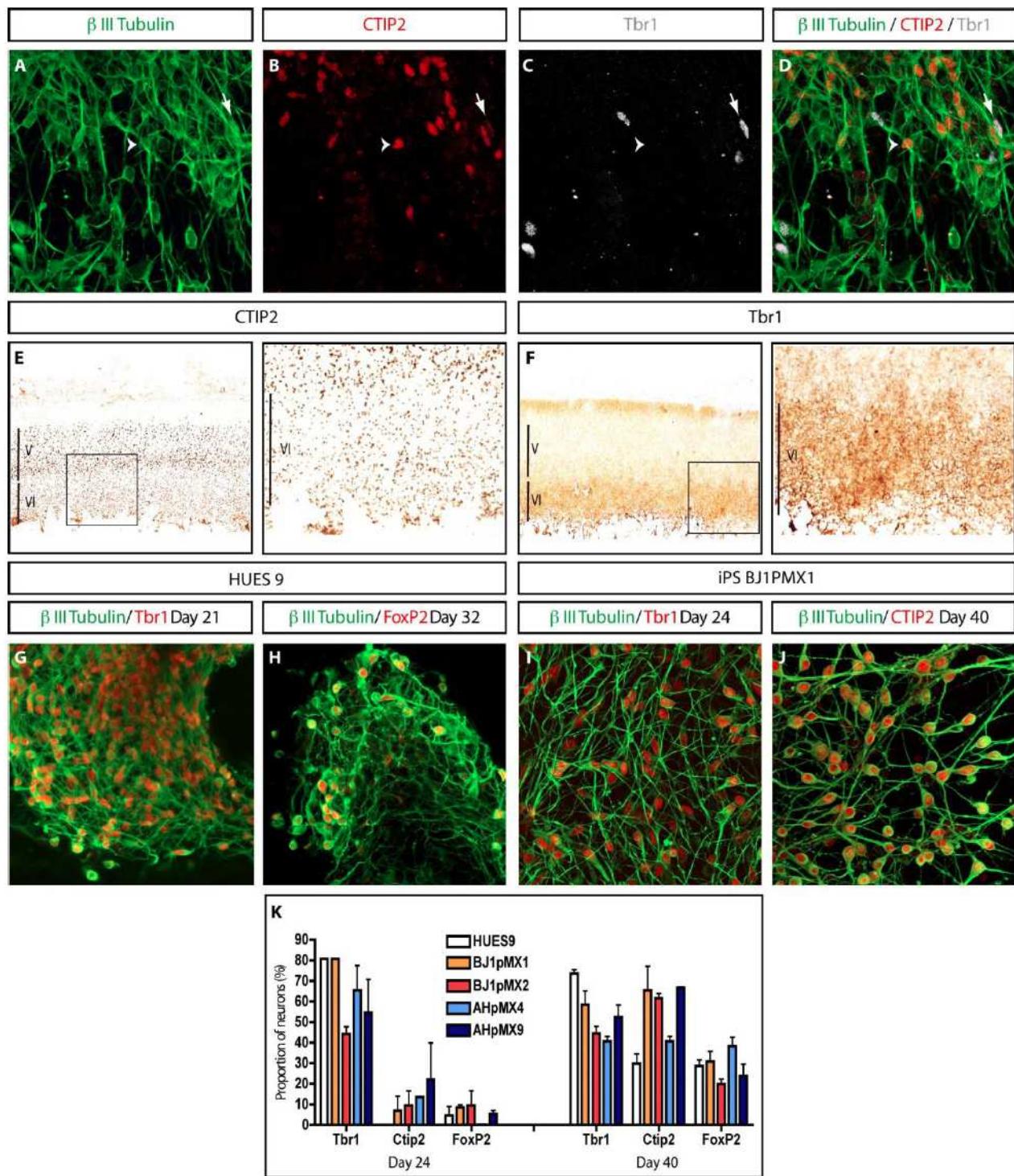


Figure S6. Pattern of expression of layer-specific markers in hESC-derived cultures.

(A-D) Immunofluorescence images showing β III-tubulin (in green) (A,D), CTIP2 (in red) (B,D) and Tbr1 (in grey) (C,D) of hESC cultures at day 61. Arrowhead points to Tbr1-negative/high CTIP2-positive neuron; arrow points to Tbr1-positive/low CTIP2-positive neuron. (E-F) Immunohistochemistry on alternate sections of human cortical tissue at 19 gestational weeks for CTIP2 (E), and Tbr1 (F). Higher magnification of the depicted area shown on the right panel, illustrating expression of CTIP2 and Tbr1 in layer VI. (G-H) Immunofluorescence images showing HUES9-derived neurons expressing beta III tubulin (in green) and Tbr1 (in red) at day 21 (G), and Foxp2 (in red) (H) at day 32. (I-J) Immunostainings for beta III tubulin (in green) and Tbr1 (in red) at day 24 (I) and CTIP2 positive neurons (in red) at day 40 (J) (in red) from BJ1pMX1 iPSC. (K) Time-course of the proportion of β III-tubulin neurons expressing layer-specific markers following iPSC differentiation. Mean +/- SEM (N=2 experiments).

Figure S7. Related to Figure 2

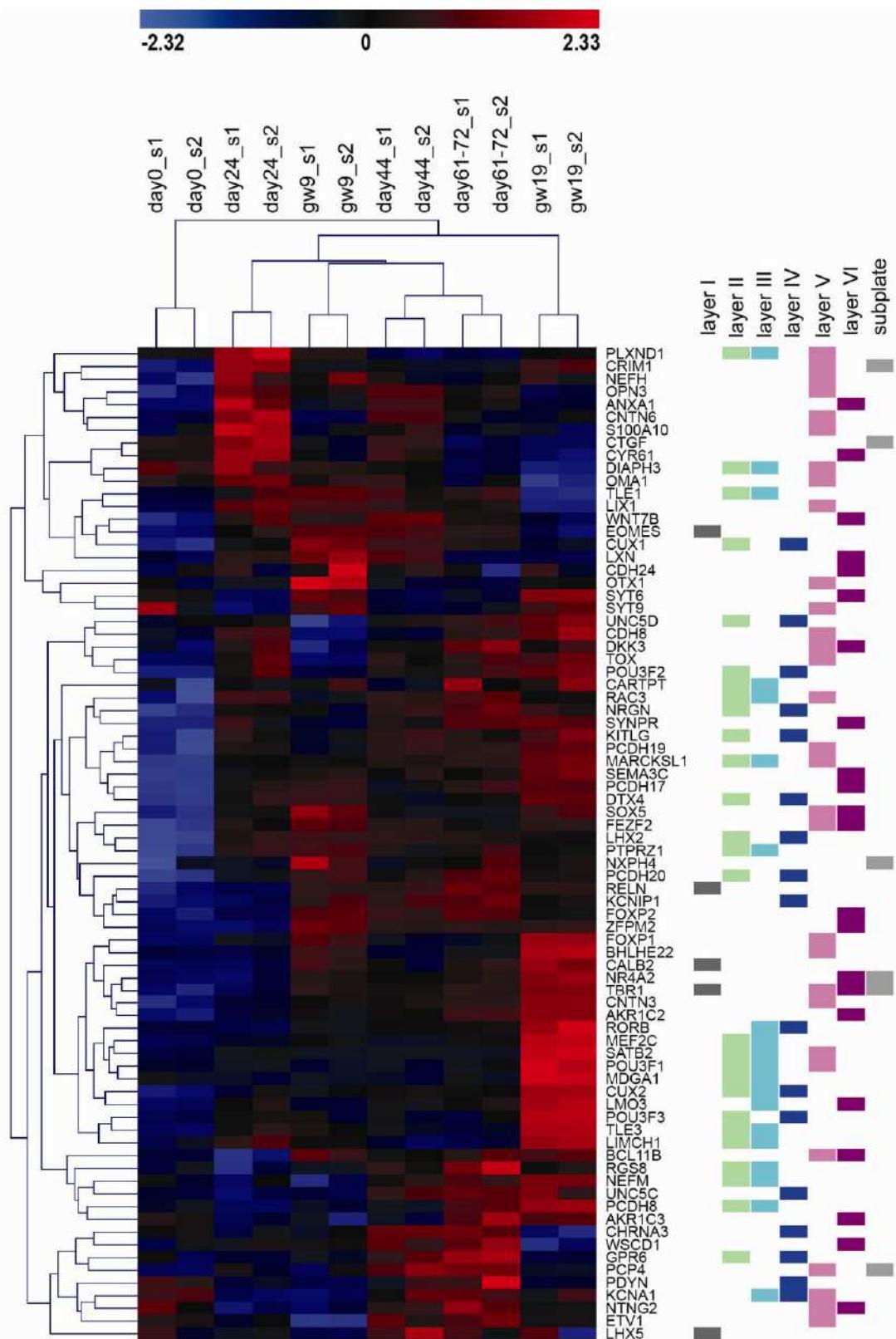


Figure S7. Cortical layer gene profiling analysis of hESC-differentiated neurons.

Heatmap showing the normalized expression of cortical layer marker genes in two samples of undifferentiated H9 hESC at day 0 (s1, s2), two sets of cells differentiated for 24, 44 and 61-72 div (s1, s2), and two samples from human embryonic cortex at 9 and 19 gestational weeks (9/19 gw) (s1, s2). (Above) Legend showing colour code for comparative levels of expression. (Right) Legend showing colour code for genes from different cortical layers in vivo.

Figure S8. Related to Figures 3 and 4

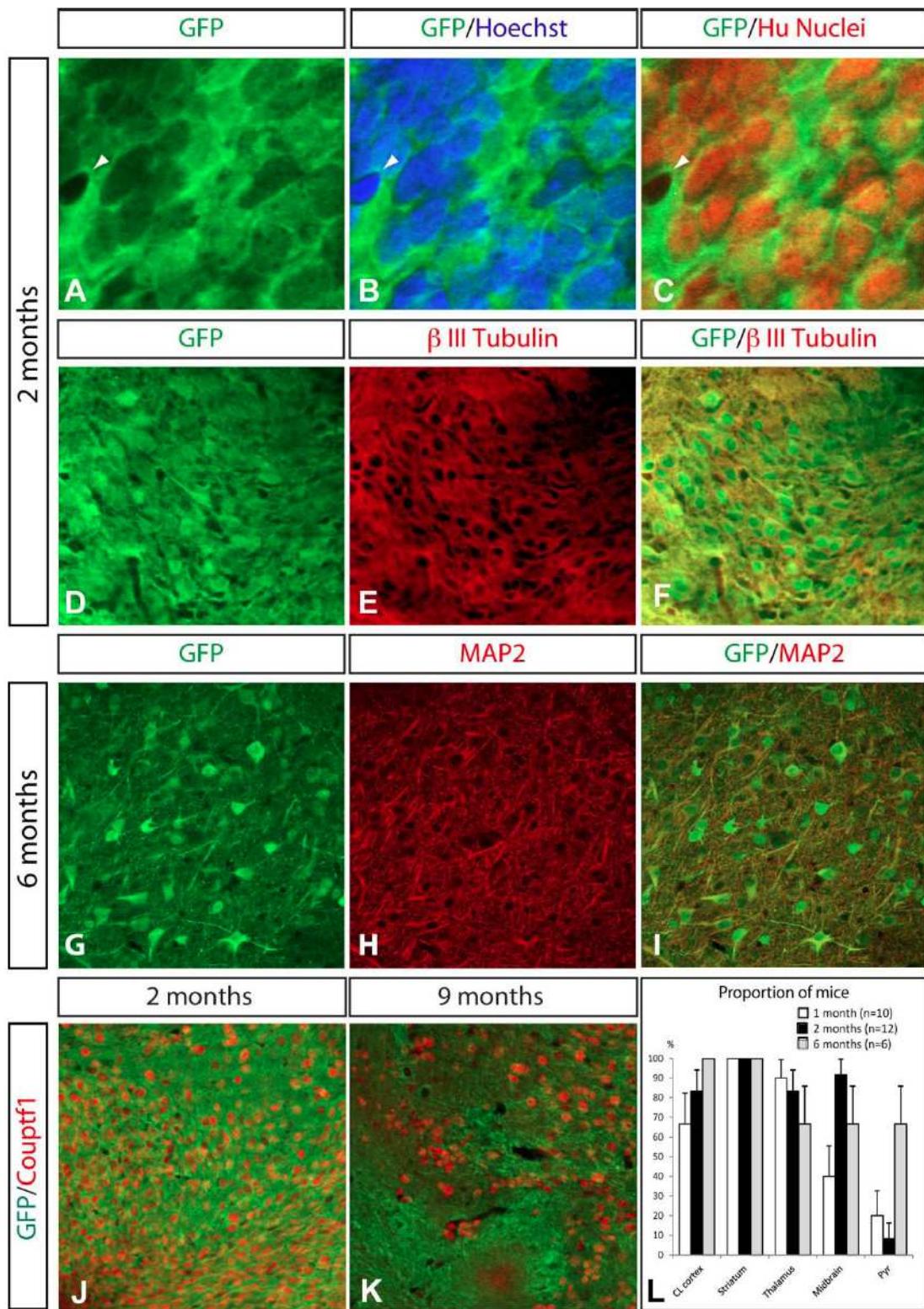


Figure S8. Characterization of the human ESC-derived cells at 2 and 6 months post-transplantation.

(A-C) Immunofluorescence images showing GFP (in green), Hoechst (in blue) (B) and human specific Nuclear antigen (Hu Nuclei) (in red) (C) 2 months following grafting. Arrowhead points to a GFP-negative mouse host cell, nucleus positive for Hoechst and negative for Hu Nuclei antigen. (D-F) Immunofluorescence images showing GFP (in green) (D,F) and β III-tubulin (in red) (E-F) 2 months following grafting. (G-I) Immunofluorescence images showing GFP (in green) (G,I) and MAP2 (in red) (H-I) 6 months following grafting. (J-K) Immunofluorescence images showing GFP (in green) and Coup tf1 (in red) at 2 (J) and 9 months (K) following grafting. (L) Quantification of the proportion of cases with GFP-positive fibers in cortical and subcortical structures after 1, 2 and 6 months. N=10 for 1 month; N=12 for 2 months; N=6 for 6 months. Values are expressed as a percentage of the total number of cases with a graft +/- SEP.

Figure S9. Related to Figures 3, 4, and 5

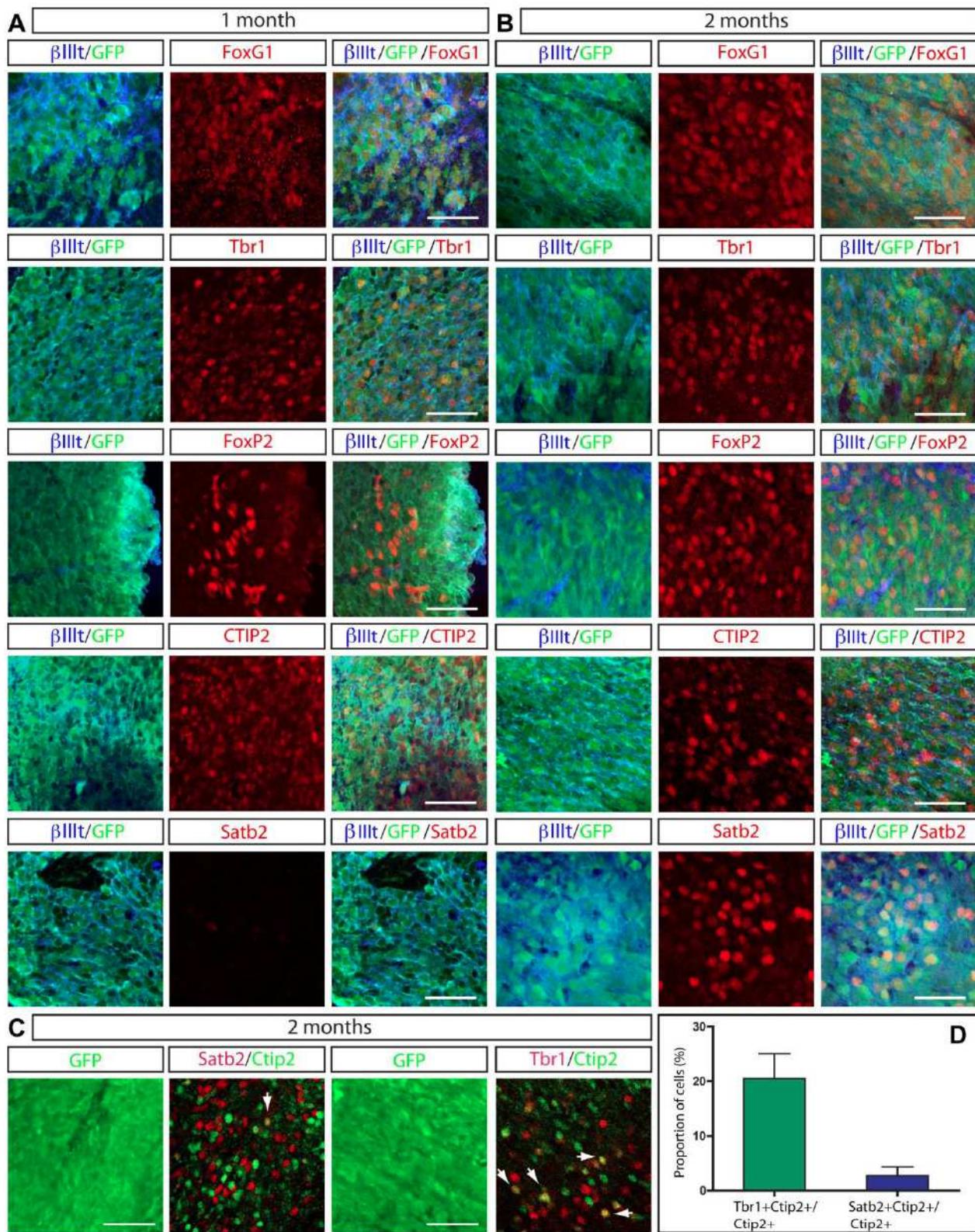


Figure S9. Immunofluorescence analysis of telencephalic and cortical layer specific markers in grafted human-ESC-derived neurons.

(A) Examples of the grafts analysed after 1 month (A) and 2 months (B) for the expression of beta III tubulin (in blue)/GFP (in green) and Foxg1 (telencephalic neurons) (in red), Tbr1 (subplate, layer I/VI) (in red), Foxp2 (layer VI) (in red), Ctip2 (layer VI/V) (in red), and Satb2 (layer V/II-III) (in red). (C) Immunofluorescence images showing GFP (left images), Satb2 (in red)-Ctip2 (in green), or Tbr1 (in red)-Ctip2 (in green) (right images) –positive cells in the grafts analysed after 2 months. Arrows point to cells co-expressing both markers. (D) Graph showing the proportion of cells co-expressing Tbr1-Ctip2 or Satb2-Ctip2 among the Ctip2+ population. Mean +/- SEP. Scale bars: 50 μ m.

Table S1. Passive membranes properties of ESC-derived neurons in vitro

Stage	I_{Na} max (pA)	AP_{amp} (mV)	AP_{th} (mV)	V_{rest} (mV)	C_m (pF)	R_m (GΩ)
Day38-day65	-594.1+/-64.3	40.1+/-1.9	-26.6+/-0.8	-39.5+/-2.5	17.2+/-1.5	2.4+/-0.2
Day68-day82	-922.3+/-222.8	53.7+/-4.4	-27.8+/-1.7	-36.6+/-3.9	23.1+/-2.8	2.2+/-0.2
p value	0,056 n.s.	0,004 $p<0.01$ **	0,527	0,654	0,082	0,627

Abbreviations: I_{Na} max, Maximum amplitud of sodium current, AP_{amp} , Amplitud of the action potential, AP_{th} , threshold of the action potential, V_{rest} , resting membrane potential, C_m , membrane capacitance, R_m , input resistance. (Ttest, n.s. non significant, ** $p<0.01$).

The APthreshold was measured from the phase plane plot as the voltage at which dV/dt increased abruptly. The APamp was calculated as a difference between the threshold and the peak of the AP. Rin was measured from the current deflection in response to a 10 mV negative voltage step from $V_{hold}=-70$ mV. C_m was calculated by measuring the charge carried by the capacitive current during the 10 mV negative voltage step from $V_{hold}=-70$ mV.

Table S2. Gene Ontology survey of hESC-derived cortical cells of genes differentially expressed between 44 and 24 days of differentiation

UP day44/ day24	GO term	GO category	N genes GO	N genes microarray into GO	P value	FDR
	GO:0048731	system development	603	102	3.65E-19	3.96E-15
	GO:0048856	anatomical structure development	2048	183	1.67E-17	9.08E-14
	GO:0007399	nervous system development	279	76	3.26E-17	1.18E-13
	GO:0032502	developmental process	3399	168	5.53E-16	1.5E-12
	GO:0007411	axon guidance	307	33	1.08E-13	2.34E-10
	GO:0007268	synaptic transmission	374	57	7.75E-13	1.4E-9
	GO:0023052	Signaling	644	80	9.32E-13	1.45E-9
DOWN day44/ day24	GO term	GO category	N genes GO	N genes microarray into GO	P value	FDR
	GO:0042127	regulation of cell proliferation	1047	119	1.47E-14	1.6E-10
	GO:0009628	response to abiotic stimulus	691	68	2.42E-14	1.31E-10
	GO:0042221	response to chemical stimulus	2293	362	6.71E-13	2.43E-9
	GO:0048518	positive regulation of biological process	3150	484	2.47E-12	6.71E-9
	GO:0050793	regulation of developmental process	1236	229	2.66E-12	5.77E-9
	GO:0032502	developmental process	3399	206	3.08E-12	5.58E-9
	GO:0050896	response to stimulus	5371	243	4.54E-12	7.05E-9

Table S3. Gene Ontology survey of hESC-derived cortical cells of genes differentially expressed between 61/72 and 44 days of differentiation

UP days61-72/ days44	GO term	GO category	N genes GO	N genes microarray into GO	P value	FDR
	GO:0007268	synaptic transmission	374	131	1.1E-31	1.19E-27
	GO:0023052	signaling	644	139	1.79E-23	9.73E-20
	GO:0007267	cell-cell signaling	633	136	1.02E-22	3.7E-19
	GO:0007154	cell communication	827	161	4.41E-22	1.2E-18
	GO:0006836	neurotransmitter transport	73	36	1.58E-14	3.43E-11
	GO:0007399	nervous system development	279	82	1.88E-14	3.4E-11
	GO:0048731	system development	603	137	1.25E-13	1.94E-10
DOWN days 61-d72/ days44	GO term	GO category	N genes GO	N genes microarray into GO	P value	FDR
	GO:0022402	cell cycle process	792	240	7.11E-58	7.72E-54
	GO:0022403	cell cycle phase	470	168	1.03E-47	5.61E-44
	GO:0000278	mitotic cell cycle	306	123	1.32E-40	4.77E-37
	GO:0007049	cell cycle	526	162	2.44E-36	6.61E-33
	GO:0051301	cell division	302	114	8.47E-36	1.84E-32
	GO:0006259	DNA metabolic process	607	172	1.14E-33	2.06E-30
	GO:0016043	cellular component organization	2967	367	1.41E-30 -12	2.18E-27

Supplemental Experimental Procedures

ESC/iPSC culture and differentiation.

Human ESC HUES9 (Cowan et al., 2004) and H9 (Thomson et al., 1998), and iPSC (BJ1pMX1,BJ1pMX2,AHpMX4, and AHpMX9) lines were propagated using standard procedures on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts (MEF).

At 24 div of the differentiation the progenitors were manually dissociated and cells were resuspended in DDM supplemented with B27 and ROCK inhibitor (10 µM) and plated onto poly-Lysin/Laminin coated coverslips. Five to seven days after dissociation, half of the medium was replenished with Neurobasal supplemented with B27 (10 ml B27 per 500 ml DDM) and 2mM glutamine, and changed again every 5-7 days.

For experiments comparing mouse and human ESC differentiation, cyclopamine was also added at 2-10 div.

iPSC generation and ESC viral transduction.

BJ1 fibroblasts (neonatal foreskin) and AH fibroblasts (derived from a forearm biopsy of a 32-year old female donor) were cultured in fibroblast medium consisting of DMEM with 10 % FBS, 1% sodium pyruvate, 1 % penicillin/streptomycin (all reagents were from Invitrogen). The retroviral pMXs vectors containing cDNAs for OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC (Lowry et al., 2008) (obtained from Addgene) were co-transfected with packaging-defective helper plasmids into 293T cells using FuGENE6 (Roche).

For a 175 cm² T-flask with 6 x 10⁶ 293T cells 1250 µL DMEM were used with 75 µL FuGENE6 and 100 µg DNA (vector:gag-pol:vsv-g in a ratio of 4:3:1). The viral supernatant was harvested on two consecutive days starting two days after transfection,

was filtered through a 0.45 µm cellulose acetate filter and concentrated 60-fold using Amicon Ultra centrifugal filter units (Millipore, 100 K).

Fibroblasts were infected with fresh virus preparations one day after seeding them in a density of 100,000 cells/well of a 6-well plate with 5 µg/mL protamine sulphate (Sigma). Four days after infection the cells were passaged with trypsin/EDTA (Invitrogen) on irradiated MEFs. One day after the passage the medium was changed from fibroblast medium to hES medium. Based on their morphology iPS cell colonies were picked manually 16-21 days later.

H9 cells were stably transduced using a lentiviral vector for the ubiquitous expression of GFP under the control of the chicken β-actin promoter and with a puromycin selection cassette (Addgene). For the infection, cells were dissociated using Stem-Pro Accutase, resuspended on MEF-conditioned hES/hiPS cell medium supplemented with ROCK inhibitor (10 µM) and incubated on gelatin-coated dishes for 30 min at 37°C to remove the remaining MEFs. Supernatant was recovered and cells were incubated in suspension with the viral particles for 3-4 hours at 37°C. Cells were washed several times, centrifuged and plated on mitotically inactivated MEFs. After 2-3 days, selection using 300 ng/ml puromycin was started and continued for about 7 days.

Human embryonic/fetal cortical samples

The study was approved by the three relevant Ethics Committees (Erasme Hospital, Université Libre de Bruxelles, and Belgian National Fund for Scientific Research FRS/FNRS) on research involving human subjects. Written informed consent was given by the parents in each case. Human fetuses were obtained following medical pregnancy termination. Two fetuses aged 9 and 19 GW were used for the microarray analyses,

while additional cases used for immunostainings ranged from 9 to 24 GW. All the cases were examined with standard feto-pathological procedures and none displayed clinical or neuropathological evidence of brain malformation. As soon as possible after expulsion (less than 6 hours), the brain was removed, embedded as a whole in OCT compound (Sakura), and snap-frozen in a 2-methylbutane on dry ice bath. The whole brain was then cryosectioned coronally (sections of 25 microns). Cortical samples used for RNA extraction were dissected manually from the sections. For the sample at 9GW the whole thickness of the cortical hemisphere was collected, while for the samples at 19GW, the upper third corresponding to the cortical plate was collected before RNA extraction as described in (Lambert et al., 2011).

Embryoid body differentiation.

iPSC colonies were detached by collagenase IV treatment and grown in suspension in 6-well low attachment plates (Corning, NY, #3471) in hES medium containing 20% KO serum without FGF-2 and Plasmanate (Bock et al., 2011). After 10 days the EBs were allowed to attach on gelatin-coated coverslips and were cultivated for 10 more days.

Axonal tracing.

BDA (10% in PBS) was applied iontophoretically (7 μ A, 15 min) through glass micropipettes (internal tip diameter: 8-10 μ m) into the ipsilateral dorsal lateral geniculate nucleus (DLG) (with respect to the transplantation side) at the following stereotaxic coordinates: anterior, -2.30 mm; lateral, 2.2 mm; dorsal, 2.7 mm. BDA was detected by avidin or streptavidin fluorophore conjugates (see tables primary and secondary antibodies).

Alexa Fluor 568-conjugated Dextran (0.5 μ l, 1% in distilled water; Molecular Probes) tracer was injected with a Hamilton syringe into the ipsilateral superior colliculus (SC) at

the following stereotaxic coordinates: anterior, -4.04 mm; lateral, 0.80 mm; dorsal, 1.50 mm.

qRT-PCR analysis.

mRNA was extracted from cells using the RNeasy RNA preparation minikit (Qiagen). DNase treatment was performed after RNA purification using DNase I Turbo DNA-freeTM kit (Ambion Inc. Austin, TX) for 30 min at 37°C. First strand cDNA was synthesized from 500 ng of DNase I-treated total RNA with random primers (Invitrogen) using SuperScriptTM II RNAs H-RT (Invitrogen). Primers for qPCR reaction were designed with either PrimerExpress software (Applied Biosystems), from the websites Invitrogen Oligo perfect or primer bank Harvard Medical School. The efficiency of qPCR amplifications was validated in four different cDNA dilutions from human embryonic brain tissue with YWHAZ primer set as normalizer. The quantitative PCR reaction mixtures consisted of LightCycler 480 SYBR Green I Master (Applied Biosystems), 250 nM of primers and 12,5 ng cDNA. The reaction steps were an initial denaturation step of 10 min at 95°C, thermal cycling conditions were 15 s at 95°C and 1 min at 60°C for 40 cycles. Relative expression levels of the different genes are given as a percentage of YWHAZ or GADPH (normalizer housekeeping gene): $2^{-\Delta\Delta Ct}$ whereby $\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{normalizer}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{reference}$. Primer sequences are described in the table below. Statistical analysis was done following t-test analysis and indicated as * for p<0.05; ** for p<0.01; *** for p<0.001.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
Blbp	GGACTCTCAGCACATTCAAGAA	CCACATCACCAAAAGTAAGGGT
Cripto (TDGF1)	AAGATGGCCCCTCTCTTAC	AGATGGACCGAGCAAATTCTTG
c-Myc	CGGAACCTTGTGCGTAAGG	CTCAGCCAAGGTTGTGAGGT
c-Myc viral	ACTCTGAGGAGGAACAAGAA	TATCGTCGACCACTGTGCTG
CTIP2	GAGTACTGCCAAGGTGTT	TAGTTGCACAGCTCGCACTT
Cux1	GCTCTCATGCCAACATCACT	TCTATGGCTGCTCCACGT
Cux2	AAGGAGATCGAGTCGCAGAA	CTCCAGGATGCTTGTGATGG
Dlx2	ACGCTCCCTATGGAACCAAGTT	TCCGAATTTCAGGCTAAGGT
DNMT3b	CCCATTGAGTCCTGTCATT	GGTTCCAACAGCAATGGACT
Emx1	AGGTGAAGGTGTGGTCCAG	AGTCATTGGAGGTGACATCG
Emx2	GCTTCTAAGGCTGGAACACG	CCAGCTCTGCCTTTGAAAC
Etv1	CTGCCTGCAGTCAAGAACAG	GAGGGCCTCATTCCCACT
Foxg1	GCCACAATCTGCTCCCTCAACA	CGGGTCCAGCATCCAGTAG
Foxp1	GTGGCAAGACAGCTCCTTCT	ATAGCCACTGACACGGGAAC
GADPH	CGCTCTCTGCTCCCTCTGTT	CCATGGTGTCTGAGCGATGT
Gbx2	GGTGCAGGTGAAAATCTGGT	CCTGTCTTGAATTGGCATT
Gsx2	CGCCACTTACCTGAACCTGT	CCCTCCTCTTGTGCTTCAC
hTERT	CCCTCTGCTACTCCATCCTG	GTGTCGAGTCAGCTTGAGCA
Irx3	CCGTATGGCCAGTACCAAGTT	ATAAGCGTTTCCCTCCTCGT
KLF4	TATGACCCACACTGCCAGAA	TGGGAACCTGACCATGATTG
KLF4 viral	CCCAATTACCCATCCTTCT	TATCGTCGACCACTGTGCTG
Nanog	TACCTCAGCCTCCAGCAGAT	CCTTCTGCGTCACACCATT
Nkx2.1	CGACTCCGTTCTCAGTGTCTGA	CCTCCATGCCACTTCTTG
Oct4	TGTACTCCTCGGTCCCTTTC	TCCAGGTTTCTTICCTCTAGC
Oct4 viral	GAGGAGTCCCAGGACATCAA	TATCGTCGACCACTGTGCTG
Otx1	GAGGTGGCGCTCAAGATCA	CGCGGCGGTTCTTGAA
Pax6	GTGTCTACCAACCAATTCCACAAC	CCCAACATGGAGCCAGATG
Reelin	GTAGCAAGCCCTTCAGCAAC	CCCTGAGGCCAGTACAACAT
Rex1 (ZFP42)	AACGGGCAAAGACAAGACAC	GCTGACAGGTTCTATTCCGC
Satb2	CCTCCTCCGACTGAAGACAG	TGGTCTGGGTACAGGCCCTAC
Sox1	GCAAGATGGCCCAGGAGAA	CCTCGGACATGACCTTCCA
Sox2	GCTAGTCTCCAAGCGACGAA	GCAAGAAGCCTCTCCTTGAA
Sox2 viral	AGCTACAGCATGATGCAGGA	TATCGTCGACCACTGTGCTG
Tbr2	CACCGCCACCAAACTGAGAT	CGAACACATTGTAGTGGCAG
Tbr1	ATGGGCAGATGGTGGTTTA	GACGGCGATGAACTGAGTCT
Vglut1	GAAACTCATGAACCCCCCTCA	GGGAGATGAGCAGCAGGTAG
Vglut2	ATTCCATCAGCAGCCAGAGT	TTGCTCCATATCCCATGACA
YWHAZ	ACTTTGGTACATTGTGGCTCAA	CCGCCAGGACAAACCAAGTAT

Transcriptome analyses.

Statistical analyses were performed with the R language for statistical computing with microarray data from H9 hES cells (GSM994321, GSM994322, retrieved from the GEO database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)), and from human samples (Lambert et al., 2011). Results were pre-processed together using the robust multi-array analysis (RMA) normalization with the appropriate R-bioconductor packages with standard parameters. Differential gene expression was assessed for each probe set using linear modeling and Bayesian moderated *t*-test. GO analyses were performed using the GOrilla application (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il>). Heat maps were constructed using the MeV software after averaging the signal of probe sets for each gene. Hierarchical clustering of samples and specific gene subsets was performed with the optimized Euclidian distance metric.

Calcium Imaging.

For calcium dye loading, each coverslip was incubated at 37°C for 45 minutes in the presence of 3 µM Oregon Green BAPTA 1-AM. Images were acquired using an a 63x, 0.95 numerical aperture water-immersion objective (Zeiss, Oberkochen, Germany). To excite the fluorescence of the calcium dye, a light source composed of a LED array (OptoLED, Cairn Research, UK) emitting at 488 nm was coupled to the microscope equipped with a dichroic mirror and a high-pass emission filter centered at 505 and 507 nm respectively. Using the AndorIQ software, images were acquired every 2 s, with an exposure time of 50 ms and with a resolution of 512 x 512 pixels (14 bits). The pseudo ratio (DF/F) curves corresponding to the different cells were computed offline. The pseudo ratio (DF/F₀) curves corresponding to the different cells were computed offline. The fluorescence change over time is defined as DF/F₀ = (F - F₀)/F₀, where F is the

fluorescence at any time point, and F_0 is the baseline fluorescence averaged over three consecutive images at the beginning of the recording.

For pharmacological experiment TTX (1 μ M) was applied by superfusion.

In vitro electrophysiology.

Recording pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Germany) on a P-2000 pipette puller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) and presented resistances of 5–8 M Ω m when filled with the patch pipette solutions containing the following (in mM): 119 KMeSO₄, 1 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 10 HEPES, 1 EGTA, 12 phosphocreatine, 2 Na₂ATP, 0.7 Na₂GTP, pH 7.2–3 adjusted with KOH, 280–300 mOsm/l. The extracellular solution contained (in mM): 120 NaCl, 2 KCl, 2 CaCl₂, 1.19 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 1.18 KH₂PO₄ and 11 glucose, equilibrated with 95 % O₂ - 5 % CO₂ (pH 7.4). For the recordings, the glass coverslips were transferred into a recording chamber where they were continuously perfused (2–3mL/min) with the extracellular solution at room temperature.

All recordings were made with a Dual EPC10 amplifier and acquired using the software Pulse (HEKA,Lambrecht-Pfalz, Germany). Signals were filtered at 4kHz using the built-in filter of EPC10 and digitally sampled at 20kHz. Data were analyzed with Igor Pro software (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA). Passive cellular parameters were extracted in voltage clamp by analyzing current relaxation induced by a 10 mV hyperpolarizing step from a holding potential of -70 mV. Membrane resistance and capacitance were 2.3 ± 0.5 G Ω m and 15.1 ± 2.7 pF respectively (n=14). The presence of voltage gated sodium current was assessed by submitting the cells to a depolarizing step to 0 mV from a holding potential of -70 mV. Intrinsic excitability was investigated in

current clamp by setting membrane potential at -70 mV and injecting 1 s step current pulses with 10 pA increments. Spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) were recorded at a holding potential of -70 mV. To further check the nature of spontaneous postsynaptic currents, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, CNQX (10 μ M) and D-(-)-2- amino-5-phosphonopentanoic acid, APV (10 μ M), were used to block AMPA and NMDA receptors respectively. All drugs were dissolved in the bath solution and then were applied to the preparation by superfusion. The drug solution reached a steady-state concentration in the experimental chamber in 2 min. After reaching this steady-state period, the response to the drug was measured after a prolonged application (up to 5 min).

Ex vivo electrophysiology.

Acute brain slices from 10 months post-transplanted mice were obtained as follows: Mice were deeply anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine, and transcardially perfused with ice-cold solution containing (in mM) 80 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1 CaCl₂, 5 MgCl₂, 30 NaHCO₃, 25 D-glucose and 75 sucrose (gassed with 95% O₂/5% CO₂). The brain was rapidly removed, trimmed by cutting off cerebellum and hindbrain directly behind the occipital cortex, and glued to the stage of a VT1000-S vibratome (Leica Instruments, Nussloch, Germany) to cut 300 μ m thick coronal slices in the same solution at 4 °C. Slices were incubated after cutting in artificial CSF (aCSF) containing (in mM) 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 30 NaHCO₃ and 25 D-glucose (gassed with 95% O₂/5% CO₂) for at least 20 minutes and stored thereafter at room temperature for up to 7 h. For recording one slice at a time was transferred to a chamber and continuously perfused with aCSF at 1.5 ml/min.

Transplanted cells were identified by their EGFP fluorescence and visualized using an upright microscope equipped with infrared differential interference contrast (Leica Microsystems, DMLFS, Belgium). Recordings were performed at 33 ± 1 °C. For recordings, patch pipettes (resistance 6–9 MΩ) were filled with an intracellular solution containing (in mM): 115 K-gluconate, 20 KCl, 10 HEPES, 4 Mg-ATP, 0.3 Na₂-GTP, 10 Na₂-phosphocreatine, pH adjusted to 7.3 with KOH. Current clamp recordings were performed with an EPC 10 patch clamp amplifier (HEKA Electronics, Lambrecht/Pfalz, Germany): neither bridge balance nor capacitance compensation were used *online*: rather, electrode kernels were estimated throughout the experiment by following the procedure described in (Brette *et al.*, 2008) and subsequently used to compensate *offline* the recorded data. Liquid junction potentials were left uncorrected. Signals were recorded at a rate of 20 kHz. All electrophysiological recordings were analyzed using MATLAB (The Mathworks, Natick, MA). To deliver bipolar extracellular electrical stimuli and elicit compound synaptic responses, we used an ISO-Flex stimulus isolator (AMPI, Israel) connected to two platinum wires inserted in a theta-glass pipette (1401021, Hilgenberg, Malsfeld, Germany) filled with aCSF. This electrode was placed at distances between 200 and 350 μm from the recorded neuron and current-controlled stimuli had amplitude in the range 100-500 μA and duration of 100 μs. In some experiments, synaptic inputs were blocked by adding to the bath selective antagonists of ligand-gated channels (i.e., AP-V, 50 nM; CNQX, 10 nM). All the chemicals were from Sigma, Belgium.

Tissue preparation, Immunofluorescence and immuhistochemistry.

For conventional microscopy analysis, the mice were anaesthetized with an overdose of ketamine/xylazine and perfused with phosphate-buffered saline followed by 4% paraformaldehyde. The brain was removed and postfixed in the same fixative overnight and then cut in 75 µm slices on a Leica vibratome. The mice intended for electron microscopy were perfused with a physiological saline solution, followed by 4% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde in phosphate buffer and the brains were cut in 60 µm slices before further processing.

Immunofluorescence on cells and grafted brains was performed as described previously (Gaillard et al., 2007; Gaspard et al., 2008) using primary and secondary antibodies (see tables primary and secondary antibodies below). Immunohistochemistry on human embryonic brain samples was performed as previously described (Lambert et al., 2011) using primary and secondary antibodies described in the tables below..

Primary antibodies	Species	Company	Catalog Number	Dilution
AFP	mouse	Abcam	54745	1/500
α -SMA	mouse	Sigma	A5228	1/1000
beta III tubulin (Tuj1)	mouse	Covance	MMS-435P	1/1000
beta III tubulin	rabbit	Covance	PRB-435P	1/1000
beta III tubulin	chicken	Chemicon	AB9354	1/1000
Blbp	rabbit	Chemicon	AB9558	1/2000
BrdU	mouse	Beckton Dickinson		1/300
Bm2	rabbit	Santa Cruz Biotech		
CalR	rabbit	Swant	7699/4	1/5.000
ChAT	goat	Chemicon	ab144P	1/100
Couptf1	mouse	Abcam	Ab41858	1/500
CTIP2	rat	Abcam	ab18465-100	1/500
Cux1	rabbit	Santa Cruz Biotech		1/500
Foxg1	rabbit	Abcam	ab18259	1/100
Foxp2	rabbit	Abcam	ab16046-100	1/5.000
GAD67	mouse	Chemicon	AB5406	1/2.500
GFAP	rabbit	Sigma	G9269	1/500
GFP	rabbit	Invitrogen	A6455	1/2000
GFP	chicken	Abcam	AB13970-100	1/2000
Homer1	rabbit	Synaptic Systems	160 003	1/1.000
Human Nu antigen, clone 235-1	mouse	Chemicon	MAB1281	1/500
MAP2	mouse	Sigma	M1406-2ml	1/2000
Nanog	goat	R&D	AF1997	1/20
Nestin	mouse	Covance	MMS-570P	1/1000
Nestin	rabbit	Covance	PRB-315C	1/1000
Nkx2.1	rabbit	Biopat	PA0100	1/5.000
Oct4	rabbit	Abcam	Ab19857	1/2000
Otx1/2	rabbit	Chemicon	AB9566	1/2000
Pax6	rabbit	Covance	PRB-278P	1/2.500
Pax6	mouse	DSHB	purified	1/50
Satb2	rabbit	Abcam	ab34735	1/1000
Sox2	rabbit	Millipore	AB5603	1/1000
SSEA3	rat	DSHB	MC-631	1/50
SSEA4	mouse	DSHB	MC-813-70	1/50
Synaptophysin	mouse	Synaptic Systems	101 011	1/1.000
Tbr1	rabbit	Gift from Hevner		1/10.000
Tbr2	rabbit	Chemicon	AB9618	1/2000
TRA1-60	mouse	Millipore	MAB4360	1/1000
TRA1-81	mouse	Millipore	MAB4381	1/1000
Tyrosine Hydroxylase	mouse	Chemicon	MAB318	1/400
VGat	rabbit	Synaptic Systems	131002	1/1000
VGlut1	rabbit	Synaptic Systems	135 302	1/1000
VGlut1	mouse	Medilabs	MM-0016-6P-FS	1/100

Secondary antibodies	Species	Company	Dilution
anti-mouse Alexa Fluor 488	donkey	Invitrogen	1/500
anti-rabbit Alexa Fluor 488	donkey	Invitrogen	1/500
anti-chicken Alexa Fluor 488	chicken	Invitrogen	1/500
anti-mouse cyanin3	donkey	Jackson Immunoresearch	1/500
anti-rabbit cyanin3	donkey	Jackson Immunoresearch	1/500
anti-rat cyanin3	donkey	Jackson Immunoresearch	1/500
anti-goat cyanin3	donkey	Jackson Immunoresearch	1/500
anti-mouse cyanin5	donkey	Jackson Immunoresearch	1/500
anti-rabbit cyanin5	donkey	Jackson Immunoresearch	1/500
Streptavidin Alexa Fluor 647 conjugated		Invitrogen	1/250
Avidin rhodamine red conjugated		Invitrogen	1/250

BrdU birthdating analysis in vivo.

P0 grafted mice received a single intraperitoneal injection of BrdU (50 mg/kg body weight) either at P4 or at P51. Mice were sacrificed at P61 and tissue was processed as explained before. Immunofluorescence analysis were done using primary and secondary antibodies (see tables for primary and secondary antibodies). For quantification of the proportion of BrdU cells expressing one marker, at least 80 BrdU positive cells were quantified for each condition and marker.

Quantification of axonal projections following grafting.

For the quantification of total number of fibers present in the contralateral cortex, the average number of fibers was counted in 1/6 of all the sections through the motor, visual and piriform cortex. For the striatum, the total number of fibers was counted in a single section. For the thalamus, midbrain and pyramidal tract, fibers were counted in 1/2 of the sections of each brain. Visualization of the fibers was performed with a Zeiss Axioplan upright microscope equipped with 20x and 40x dry objectives. For the quantification of the percentage of fibers present at different cortical and non-cortical targets, fibers were counted in contralateral cortex, thalamus, midbrain, pyramidal tract, substantia nigra and cerebellum in 1/4 of the brain.

Quantification of neuronal and dendritic morphology.

For the morphology study, we adapted the Pyramidal Morphology Index (PMI) (Hand et al., 2005). Pictures of at least 100 neurons stained for β -III-tubulin were taken randomly for each condition and from two different experiments and the quantification was done blindly in Adobe Photoshop Software using a 25 μm circle drawn on a superposed layer. The number (N) of neurites intersected by the circle was counted and the width (L) of the thickest dendrite at its intersection with the circle was measured. The PMI is equal to L

divided by (N-1).

Apical dendrite orientation of grafted neurons 3 weeks after grafting (N=102) was analyzed as in (Gaspard et al., 2008). Standard Sholl analysis was performed on the apical dendrite of grafted neurons 6 months (N=16 neurons) and 9 months (N=14 neurons) after grafting using Fiji software, i.e. the number of apical branches intersecting with concentric circles centered on the soma were quantified. The analysis was restricted to 90 µm from the soma, due to the increasing number of cut-off branches at larger distances. Dendrites with cut-off branches were not discarded. Comparison between the two groups was performed using the Mann-Whitney U test for non-parametric samples; **p<0.01, ***p<0.001.

Electron and confocal microscopy.

For immunogold detection of GFP, the sections were incubated in goat antibody to rabbit IgGs conjugated to ultra-small gold particles (0.8 nm, 1:100; Aurion). The immunogold signal was intensified using a silver enhancement kit (HQ silver; Nanoprobes). Serial ultra-thin immunostained sections were cut with a UC6 ultramicrotome (Leica) and were contrasted with lead citrate and observed in a electron microscope (JEOL). Confocal Images were obtained with a Zeiss LSM 510 META microscope driven by ZEN 2009 software and equipped with 20x 0.8, 40x 1.2W and 63x 1.2W objectives and green, red, far-red and 2P lasers.

Supplemental References

Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Bouling, G., Smith, Z.D., Ziller, M., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., *et al.* (2011). Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* 144, 439-452.

Cowan, C.A., Klimanskaya, I., McMahon, J., Atienza, J., Witmyer, J., Zucker, J.P., Wang, S., Morton, C.C., McMahon, A.P., Powers, D., *et al.* (2004). Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 350, 1353-1356.

Lowry, W.E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A.D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A.T., and Plath, K. (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2883-2888.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

Résumé de l'article 4 (soumis)**La lésion corticale chez l'adulte stimule la prolifération des progéniteurs neuraux de la SVZ et leur migration vers le site de lésion.**

Chez de nombreuses espèces mammifères, la neurogenèse persiste dans le cerveau adulte au sein de deux zones principales : la zone sous granulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe, et la zone sous ventriculaire (SVZ) qui borde les ventricules latéraux (pour revue, Ming et Song, 2005). En conditions physiologiques, les cellules de la SVZ donnent continuellement naissance à des progéniteurs qui migrent en chaîne via le flux rostral migratoire (RMS) en direction du bulbe olfactif où ils se différencient en neurones matures fonctionnellement intégrés aux réseaux pré-existants (pour revue, Whitman et Greer, 2009). Diverses lésions traumatiques ou neurodégénératives influent sur la neurogenèse dans la SVZ. Par exemple, dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson, la prolifération cellulaire dans la SVZ est diminuée, tandis qu'elle augmente dans des modèles animaux de la maladie de Huntington (pour revue, Winner et al., 2011). Il est généralement admis qu'une lésion corticale induit une augmentation de la prolifération cellulaire dans la SVZ (pour revue, Saha et al., 2012). Cependant, les résultats présentés dans la littérature dans le cas de lésion corticale par aspiration présentent des dissonances, tant au sujet des changements se produisant dans la SVZ suite la lésion, que sur le potentiel de migration des neuroblastes de la SVZ vers le site de lésion corticale (Goings et al., 2002 ; Sundohlm-Peters et al., 2005 ; Szele et Chasselet, 1996). En effet, si la migration des cellules de la SVZ vers des sites de lésion proches tels que le striatum est reconnue, leur capacité à migrer vers des sites plus éloignés est controversée. Ainsi, le but de notre étude a été d'analyser les conséquences d'une lésion corticale par aspiration chez la souris sur la prolifération cellulaire et la neurogenèse au sein de la SVZ. Nous avons également évalué le potentiel migratoire des neuroblastes de la SVZ à distance vers le site de lésion corticale, étudié leur mode de migration, et identifié des acteurs moléculaires régulant cette migration.

Ainsi, après lésion unilatérale par aspiration du cortex moteur chez la souris, nous avons évalué la prolifération cellulaire dans la SVZ à différents temps post-lésionnels par injections simples ou multiples de 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU). Les souris ont été sacrifiées à différents délais post-injections, et des marquages immuno-histochimiques ont permis de révéler le phénotype et le mode de migration des cellules post-mitotiques. Des injections de lentivirus exprimant la GFP dans la SVZ ont permis de vérifier l'origine des cellules BrdU⁺ ayant migré de la SVZ ; et l'injection d'un antagoniste spécifique du récepteur CXCR4 a été utilisée pour évaluer le rôle du couple SDF1/CXCR4 dans la migration des neuroblastes de la SVZ.

Nos résultats montrent que la lésion du cortex moteur induit une augmentation transitoire de la prolifération cellulaire dans la SVZ avec un pic à une semaine. Cet effet a été observé à la fois dans la SVZ ipsilatérale et la SVZ controlatérale à la lésion. Nous avons également pu observer que cette augmentation de la prolifération dans la SVZ était associée à une augmentation du nombre de cellules post-mitotiques co-exprimant un marqueur des neuroblastes immatures, la doublecortine (DCX). Ainsi, la lésion du cortex par aspiration entraîne une augmentation à la fois de la prolifération cellulaire et de la neurogenèse dans la SVZ.

Nous avons par la suite étudié la migration des neuroblastes, et observé qu'une partie d'entre eux s'échappent du RMS pour atteindre le corps calleux et le cortex péri-lésionnel. Alors que dans le RMS, les neuroblastes migrent associés en chaîne, la plupart d'entre eux migrent individuellement vers le site de lésion. De plus, l'étude des immunomarquages multiples montre que les deux tiers des neuroblastes migrent en étroite association soit avec les vaisseaux sanguins, soit avec les astrocytes. Les autres migrent isolés, sans association ni avec les cellules gliales, ni avec les vaisseaux sanguins. Ainsi, la migration ectopique des neuroblastes vers le site de lésion est multimodale, et implique notamment les vaisseaux sanguins et les cellules gliales. Nous avons par ailleurs montré que la chémokine SDF-1 et son récepteur CXCR4, déjà connus pour leur rôle dans la migration neuronale pendant le développement, sont impliqués dans la régulation de la migration ectopique des

neuroblastes vers le site de lésion. En effet, SDF-1 et CXCR4 sont surexprimés au niveau du site de lésion ; et le blocage pharmacologique de CXCR4 augmente la proportion de neuroblastes migrant individuellement, au détriment de ceux migrant en association avec les astrocytes.

Par injection dans la SVZ d'un lentivirus surexprimant la GFP, nous avons par ailleurs confirmé que les neuroblastes DCX⁺/GFP⁺ présents dans le cortex provenaient bien de la SVZ.

Enfin, la différenciation des cellules recrutées en neurones matures apparaît comme une question déterminante en vue d'évaluer leur potentiel réparateur. Nos résultats montrent que quelques uns des neuroblastes générés dans la SVZ se différencient en neurones matures dans le cortex.

En conclusion, nos résultats donnent une description détaillée chez la souris des modifications en termes de prolifération cellulaire et de neurogenèse dans la SVZ dès les premiers jours suivant la lésion corticale, et apportent des éléments de compréhension nouveaux sur les mécanismes de migration de neuroblastes de la SVZ recrutés vers le site de lésion corticale où certains se différencient en neurones matures.

Cortical lesion stimulates adult SVZ neural progenitor cells proliferation and migration to the site of injury

Bhaskar Saha^{1,2}, Sophie Peron^{1,2}, Kerren Murray³, Mohamed Jaber^{1,2}, Afsaneh Gaillard^{1,2*}

1. INSERM U1084, Experimental and Clinical Neurosciences Laboratory, Cellular Therapies in Brain Diseases Research Group, Poitiers, F-86022, France.
2. University of Poitiers, Poitiers, F-86022, France.
3. Cell Polarity, migration and Cancer Unit, Institut Pasteur, F-75724 Paris Cedex 15, France

*Correspondence:

Pr Afsaneh Gaillard

INSERM U1084, University of Poitiers

Experimental and Clinical Neurosciences Laboratory

Building B36, 1 rue Georges Bonnet,

BP 633, 86022 POITIERS cedex - FRANCE

Afsaneh.Gaillard@univ-poitiers.fr

Tel : +33-549453873

Fax: +33-549454014

Running title: SVZ proliferation and migration following lesion

Abstract

The subventricular zone (SVZ) is the principal neurogenic niche present in the adult non-human mammalian brain. Neurons generated in the SVZ migrate along the rostral migratory stream to reach the olfactory bulb. Brain injuries stimulate SVZ neurogenesis and direct migration of new neuroblasts to the sites of injury. To date, cortical injury-induced adult SVZ neurogenesis in mice remains ambiguous and migration of neuroblasts to the site of injury has not been studied in detail. We found that aspiration lesion in the motor cortex induces a transient, but significant increase in the proliferation as well as neurogenesis in the SVZ. New neuroblasts migrate ectopically to the injured area with the assistance of blood vessels and reactive astrocytes. Using lentiviral transduction, we provide direct evidence that these neurons are indeed generated in the SVZ. We further show that astrocyte-assisted ectopic migration is regulated by CXCR4/SDF-1 signaling pathway. Finally, upon reaching the lesion area, these neuroblasts differentiate into glial cells and mature neurons. These data provide a detailed account of the changes occurring in the SVZ and the cortex following lesion and indicate the potential of the endogenous neural stem cells in cortical repair.

Keywords: Cortex, Lesion, Subventricular zone, Neuroblast, Proliferation, Migration, Differentiation.

1. Introduction

In the adult rodent brain, more generally in non-human mammals, neurogenesis continues to occur in two main regions, the subventricular zone (SVZ) lining the lateral ventricle and the subgranular zone of the hippocampus (Altman and Das, 1965; Doetsch et al., 1997, Gage et al., 1998). New neurons generated in the SVZ migrate along a well-defined pathway, the rostral migratory stream (RMS), to reach the olfactory bulb (OB) and differentiate into granule cells and periglomerular cells and integrate into the existing circuitry (Luskin 1993; Lois and Alvarez-Buylla, 1994).

The discovery of adult neurogenesis and neuronal migration has generated great interest in the field of cell replacement therapy following neuronal degeneration. In several pathophysiological conditions, the proliferative capacity of the SVZ is altered (reviewed in Saha et al., 2012). For instance, in animal models of cerebral ischemia and Huntington's disease, the SVZ proliferation is increased significantly (Arvidsson et al., 2002; Decressac et al., 2010), whereas it is reduced in Parkinson's disease and Alzheimer disease (Hoglinger et al., 2004; Rodriguez et al., 2009). In different cortical injury models, however, conflicting reports on the SVZ proliferation has created confusion in the understanding of lesion-induced proliferation. While in controlled cortical impact (Ramaswamy et al., 2005), fluid-percussion injury (Chirumamilla et al., 2002; Chen et al., 2003) and focal acute injury (Blizzard et al., 2011), a significant increase in the SVZ progenitor proliferation has been observed, no significant change was reported with aspiration lesion model (Dizon et al., 2006).

In addition to proliferation, brain diseases and injuries have been shown to induce migration of the neural progenitors to the sites of injury (Arvidsson et al., 2002; Ramaswamy et al., 2005; Sundholm-Peters et al., 2005; Faiz et al., 2008). In cerebral ischemia, involvement of blood vessels in guiding ectopic neuroblast migration was reported (Thored et al., 2007; Kojima et al., 2010). However, the mechanisms underlying the ectopic migration of the neuroblasts in response to cortical lesion are largely unknown.

Here, we set out to study changes taking place in the forebrain following aspiration lesion of the motor cortex in adult mice. We showed that aspiration lesion in the motor cortex induces a transient, but significant increase in the proliferation as well as neurogenesis in the SVZ. We analyzed lesion-induced changes in the cortical microenvironment and their role in the ectopic migration of new neuronal progenitors and demonstrated, for the first time, that both re-organized blood vessels and reactive astrocytes form scaffolds to assist migration. GFP-expressing lentiviral transduction in the SVZ confirmed that these neurons are indeed originated in the SVZ. Finally, we show here that neuroblasts migrating to the lesion area differentiate into glial cells and also into mature neurons, although to a much lesser extent.

2. Material and Methods

2.1 Cortical lesion

For all experiments, adult (4–6 month-old, females and males) C57BL/6 mice were used. Housing of the animals and all animal experimental procedures were carried out according to the guidelines of the French Agriculture and Forestry Ministry (decree 87849) and of the European Communities Council

Directive (86/609/EEC). All efforts were made to reduce the number of animals used and their suffering.

Mice were anaesthetized with avertin (250 mg/kg of body weight), placed in a stereotaxic apparatus and the left motor cortex was aspirated from approximately 0.5–2.5 mm rostral to the Bregma and from 0.5–2.5 mm lateral to the midline using a fire-polished pipette, with the corpus callosum left intact. After lesion, the skin was stapled and the mice were kept for recovery.

2.2 Lentivirus injection

A custom-made GFP expressing [under phosphoglycerate kinase, (PGK) promoter] lentivirus was prepared as described before (Consiglio et al., 2004; Grubb et al., 2008) to transduce SVZ/RMS neuroblasts. For stereotactic injections, three days after lesion mice were anaesthetized as mentioned above and approximately 1.5 μ l of solution containing the virus (2×10^{10} U/ml) was injected near the head of SVZ (anteroposterior +0.4 mm from bregma, mediolateral 1.08 mm and dorsoventral 1.8 mm) using a picoinjector (Picospritzer III, Parker) with the following parameters: pressure 8 psi, time: 4.0 sec. Mice were sacrificed either 8 days or 21 days following injection.

2.3 BrdU injections

For proliferation studies, mice were injected with a single BrdU dose (50mg/kg body weight, in 0.9% NaCl solution) 4 hours before perfusion. For differentiation studies, long-term BrdU assay was performed at a similar dose twice daily for 3 days (at day 6, day 7 and day 8 after lesion) and mice were sacrificed 30 days after last injection.

2.4 AMD3100 injection

SDF1/CXCR4 signaling was blocked in lesioned mice using AMD3100, a specific CXCR4 blocker. Following cortical lesion, animals were injected with 1.25 mg/kg AMD3100 (Sigma) subcutaneously twice per day (with an interval of 6 hours between two injections) for seven days as described in Rubin et al., 2003. After the final injection, mice were perfused and brains were harvested and processed for immunostaining.

2.5 Brain harvesting

Mice were injected with a lethal dose of avertin and transcardially perfused with 50 ml of saline (0.9%), followed by 200 ml ice-cold paraformaldehyde (PFA, 4%) in 0.1 M phosphate buffer (PB). Brains were removed and kept overnight in 30% sucrose solution for cryoprotection. With a freezing microtome (RM2145, Leica), 40 μ m tissue sections (coronal and parasagittal) were cut for antibody staining. For the proliferation study, lesion mice were perfused 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 30 and 60 days after lesion.

2.6 Immunohistochemistry

Free-floating sections were washed in Tris-buffered saline (TBS, 0.05M, pH 7.6) and blocking was done at room temperature (RT) for 1 hour by TBS containing 3% bovine serum albumin (Sigma) and 0.3% Triton X-100. Primary antibodies, diluted in blocking solution, were applied overnight at 4°C. Secondary antibodies were applied for 1 hour at RT. The following antibodies were used in this study: goat anti-Doublecortin (1:300, Santacruz Biotech.), mouse anti-PSA-NCAM (IgM, 1:500, AbCys), rat anti-CD31 (1:250, BD Pharmingen), rabbit anti-GFAP (1:500, DakoCytomation), rat anti-BrdU (1:200, ABD Serotec), rabbit anti-CXCR4 (1:200, Chemicon), goat anti-SDF-1 (1:50, Santacruz Biotech.), mouse anti-NeuN (1:500, Millipore), rabbit anti-

NG2 (1:300, Chemicon), Chicken anti-GFP (1:1000, Chemicon), rabbit anti-Olig2 (1:500, Chemicon), mouse anti-reelin (1:1000, kind gift from A. Goffinet), ToPro-3 (1:1000, Molecular probes).

2.7 Data acquisition and statistical analysis

Sections were selected and photographed with an epifluorescence microscope (AxioImager.M2, Zeiss). Colocalization studies were carried out using confocal microscopy (FV1000; Olympus). All results are expressed as mean \pm SD. Comparisons between each group with the control mice were performed by using two-tailed student's *t* test and the level of statistical significance was set at P<0.05.

3. Results

3.1 Cortical lesion enhances cell proliferation in the subventricular zone

To study the effect of cortical lesion on the SVZ cell proliferation, a single injection of BrdU was administered 4 hours before sacrificing the mice at different days (1,2,3,5,7,9,12,15,30 and 60 days) following cortical lesion (n=6 at each time point). Cortical lesion induced a significant increase in the number of BrdU+ cells in the SVZ of lesioned animals compared to non-lesioned control animals (Fig.1 A-E). This was observed both in ipsilateral and contralateral hemispheres (at day 3, control: 115.66 \pm 7.38 mean \pm SD; ipsilateral: 159.15 \pm 9.65 and contralateral 141.7 \pm 13.62; P<0.05). Proliferation reached its peak 7 days after lesion (ipsilateral 212.68 \pm 12.58; contralateral 177.58 \pm 10.66, P<0.001) and then gradually decreased (Fig. 1E). Surprisingly, 1 month after lesion, SVZ proliferation was even lower than in control SVZ, more prominently in the contralateral hemisphere (ipsilateral 103.72 \pm 9.83, P>0.05; contralateral 80.1 \pm 12.79, P<0.05 Fig. 1E). However, by two months

after lesion, proliferation of the SVZ returned to basal level (ipsilateral 118.88 ± 12.26 ; contralateral 103.22 ± 16.09 , Fig. 1E). The proliferation in the ipsilateral hemisphere was significantly higher than contralateral at all time points investigated ($P < 0.05$) except at day 60 ($P > 0.05$). Thus, these results indicate that cortical lesion induces a significant, but transient increase in cell proliferation at the level of the SVZ following cortical lesion.

We next investigated whether increased cell proliferation also leads to an increase in the generation of new neuroblasts. At day 7, when the proliferation was highest, sections from both control ($n=5$) and 7 day lesioned animals ($n=5$) were immunostained with BrdU and Doublecortin (Dcx), a neuroblast marker, and the number of BrdU+/Dcx+ cells present in the SVZ was quantified (5 sections/brain from anteroposterior +1.18mm to +0.02mm relative to Bregma). We observed a significant increase (+58%) in the number of BrdU+/Dcx+ cells in the SVZ (140 ± 5.29) compared to unlesioned control mice (88.75 ± 4.06) ($P < 0.001$) (Fig. 1F-H). All together, these results demonstrate that aspiration lesion in the cortex not only leads to an increase in the SVZ cell proliferation, but also to neurogenesis.

3.2 Neuroblasts from the SVZ/RMS migrate to the lesion area

It has been previously shown that in response to brain injury or degeneration, neuroblasts can move out of the SVZ/RMS and migrate to the affected area (Arvidsson et al., 2002; Ramaswamy et al., 2005; Sundholm-Peters et al., 2005; Faiz et al., 2008). However, the migration pattern was not studied in detail. Here, we analyzed the nature of ectopic migration at different stages following lesion. We found that although the majority of the neuroblasts continued to migrate normally along the RMS to the OB after lesion, a large

number of Dcx+ cells deviated from their original path and invaded the corpus callosum and the cortex adjacent to the cortical lesioned area (Fig. 2A, E schematic; compare Fig. 2B and C, lesion area shown in 2F). To evaluate the extent of ectopic cell migration, we quantified the number of Dcx+ neuroblasts leaving the SVZ/RMS and entering the corpus callosum and the cortex. For this, we used 6 sections from each brain, and quantified the cells at the site where the cortical lesion was observed ($n=4$). Two days after lesion, 177 ± 16 cells were found to move out of the SVZ/RMS, most being in the corpus callosum and a few started entering the deep cortical layer (Fig. 2G). Supplementary figure S1A-C shows detail of the soma and leading process of the migrating neuroblasts expressing DCX. By 7 days, as many as 246 ± 29 cells ($n=5$) moved out of the RMS. While many cells were present within the corpus callosum, several had invaded the deep cortical layers and a few could be detected near the lesioned area (Fig. 2H). Migrating neuroblasts showed typical unipolar or bipolar morphology with the presence of leading processes (Fig. 2I). After 15 days, neuroblasts continued to migrate away from the SVZ/RMS (283 ± 62 cells; $n=5$) and many cells were very close to the lesion core (Fig. 2J). This migration of neuroblasts from the SVZ to the lesioned site appears to be persistent as Dcx+ migrating cells could be found in the deep and upper cortical layers even 30 days after lesion (159 ± 38) (Fig. 2L). Once the neuroblasts arrived close to the lesioned area, they started to exhibit more mature and complex morphology with longer extensions and branches (Fig. 2K, at day 15; M, at day 30). Dcx+ neuroblasts were still found in the corpus callosum and all through the cortical mantle even 60 days after lesion

indicating that the ectopic migration is not a transient phenomenon (data not shown).

'Chain' migration is the hallmark of neuroblasts present along the RMS (Lois et al., 1996), while in the OB radially migrating cells remain individualized. Following cortical lesion, just after they exit from the RMS, some of the neuroblasts in the corpus callosum remained in clusters (Fig. 2D, asterisk) while most of them migrated individually (arrowheads in Fig. 2D). However, further into the cortex, neuroblasts always remained individual and did not form any 'chain' or cluster.

3.3 Majority of ectopic neuroblasts migrate along with blood vessels or glial cells

Next, we aimed to determine the micro-environmental cues that can possibly guide the ectopic migration of neuroblasts from the SVZ to the cortex. Recently, the role of blood vessels in neuroblast migration both in the normal, as well as in ischemic brain was demonstrated (Whitman et al., 2009; Kojima et al., 2010). In the normal cortex, a complex network of blood vessels were seen by immunostaining with an endothelial cell marker CD31 (Fig. 3A). By day 3 after lesion, blood vessels in the lesion area started reorganizing in parallel and directed to the lesion site (Fig. 3B). At 7 days post lesion, reorganized vessels were less reticular compared to control (Fig. 3C). By 30 days, many long parallel vessels were seen around the lesion area (Fig. 3D). This morphological change appeared to be persistent as even after 2 months of lesion the parallel orientations were maintained (data not shown). Such blood vessel reorganization prompted us to investigate whether it has any role in guiding cell motility to the lesion area. Co-immunolabeling of 7 days post

lesion brain sections using CD31 and Dcx revealed that indeed many ectopic neuroblasts navigating to the lesion area were either in contact or run closely in parallel with blood vessels (Fig. 3E). Confocal imaging and 3D reconstruction showed that the neuroblasts can establish physical contacts with the blood vessels (Fig. 3F, G). Interestingly, after 15 days, neuroblasts near the lesion core were no longer associated with blood vessels (Fig. 3H).

Cortical lesion leads to activation of glial reaction in the forebrain (reviewed in Chen and Swanson, 2003; Carbonell et al., 2005). We observed a massive up-regulation of reactive astrocytes soon after lesion (supplementary figure S2 A-D). A large number of ectopic neuroblasts in the cortex remained closely associated with these GFAP+ reactive astrocytes 7 days and 15 days post-lesion (Fig. 3I, J). To quantify the number of ectopic Dcx+ cells either in association with blood vessels or with astrocytes, we performed triple immunohistochemistry using Dcx/CD31/GFAP 7 days following lesion. A higher percentage of Dcx+ cells migrate to the cortex in association with blood vessels (40.13%) as compared to association with glial cells (24.93%) (n=6, 6 sections/brain). Apart from blood vessels and astrocytes association, a significant number of neuroblasts (34.94%) were found to migrate within the cortex without any such association suggesting that some other factor(s) may possibly be responsible for migration of these cells (asterisk in Fig. 3K, L). This indicates that ectopic migration of neuroblasts in response to lesion is assisted by multiple micro-environmental cues/factors, among which blood vessels and glial cells seem to be of high importance.

3.4 Direct visualization of SVZ-derived ectopic migration

It can be argued that, following cortical lesion, neuroblasts are generated within the cortex itself, and not in the SVZ/RMS, as some previous reports indicated that new neurons can be formed in the cortex following layer VI cortico-thalamic neuron degeneration (Magavi et al., 2000), traumatic brain injury (Rice et al., 2003) and infrared-laser lesion of the visual cortex (Sircu et al., 2009). Therefore, to ascertain that the source of these ectopic neurobalsts is indeed the SVZ/RMS, we injected lentivirus expressing GFP into the ipsilateral SVZ/RMS of the lesioned mice (n=4). Lentiviral construct was injected on day 3 following lesion, a time when many cells start to leave the RMS. Eight days post injection (dpi) we found that most of the GFP-expressing neuroblasts are in the RMS (Fig. 3M), few in the OB (data not shown) and some cells started leaving the RMS (inset, Fig. 3M). In the cortex, GFP+ cells with migratory morphology also expressed Dcx indicating that these cells were indeed neuroblasts (Fig 3N, inset). Thus, the neuroblasts migrating towards the lesioned cortex are generated in the SVZ/RMS. In addition, ectopic neuroblasts migrated in association with either blood vessels (Fig. 3O) or astrocytes (Fig. 3P), which confirmed our previous findings.

3.5 Expression of SDF-1 and CXCR4 is increased around the lesion area

The role of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 is well established in neuronal migration in the developing brain (Stumm and Holt, 2007) as well as in pathological conditions (Imitola et al., 2004). We observed an intense staining of secreted SDF-1 around the lesion area within 1day after lesion, but not in the control cortex (Fig. 4A, B). This strong staining remained for 1 week and then decreased gradually (data not shown). No detectable expression was observed in the contralateral hemisphere. Similarly, expression of

CXCR4, receptor of SDF-1, was also increased transiently in the ipsilateral cortex following lesion (compare Fig. 4C and D). An intense expression was observed within 1 day after lesion, which was even higher after 3 days.

At a cellular level, both SDF-1 and CXCR4 were expressed by reactive astrocytes present in the lesioned cortex. Punctate staining of secreted SDF-1 was found around the cell surface while CXCR4 was expressed strongly in the astrocyte cell body (Fig. 4E, F respectively). Interestingly, many cells near the lesion site with an upregulated reelin expression, also co-expressed CXCR4 (Fig. 4G). We also observed few mature neurons near the lesion area co-expressing CXCR4 (Fig. 4H-H’). In the RMS, CXCR4 was expressed by Dcx-positive neuroblasts (Fig. 4I). This was also the case for neuroblasts leaving the RMS following cortical lesion (Fig. 4J). However, later during migration, CXCR4 expression was down regulated in the neuroblasts (data not shown).

3.6 Blockade of CXCR4 alters neuroblast migration patterns to the lesion site

In order to better determine the role of CXCR4/SDF-1 signaling in neuroblast migration, we injected subcutaneously AMD3100, a non-peptide antagonist of CXCR4 that inhibits CXCR4 binding to SDF-1, twice daily for 7 days following cortical lesion. Triple immunostaining using Dcx/GFAP/CD31 was performed on sections from both AMD3100 treated and untreated lesioned animals to assess any change in the mode of neuroblast migration. The percentage of neuroblasts migrating in close association with either blood vessels or astrocytes or with no association was compared between lesioned+AMD3100 administered animals and lesion-only animals (control). The difference in the

percentage of neuroblasts migrating in association with blood vessels in the AMD3100 treated mice (39.22%) was insignificant compared to lesion-only (40.13%) (Fig. 4K, $P>0.05$). In contrast, a significant reduction was observed with cells migrating along with astrocytes (15.58% in AMD3100 treated and 24.93% in untreated mice, $P<0.05$). Concomitantly, the percentage of cells migrating without any association was found to be increased significantly (45.11% in AMD3100 treated and 34.94% in untreated brains, $P<0.05$). This suggests that CXCR4/SDF-1 signaling pathways regulate ectopic migration of neuroblasts that are in association with the astrocytes.

3.7 Proliferating cells differentiate into mature neurons and glial cells

Effective repair mechanism after cortical damage requires maturation of neuroblasts to replace injured neurons. To determine the fate of proliferating cells after motor cortex lesion, we undertook two different approaches:

A) A long-term BrdU assay where 6 injections (2 injections on day 6, day 7 and day 8 after lesion) of BrdU were performed into lesioned mice ($n=6$) that were sacrificed 30 days later. Most of the BrdU+ cells were present around the lesion core, densely populated with GFAP+ astrocytes forming a glial scar (Fig. 5A). Many of these astrocytes co-expressed BrdU suggesting that these cells were generated after lesion (Fig. 5B-D). In the ipsilateral cortex a significant number of BrdU+ cells differentiated into Olig2+ oligodendrocytes (Fig. 5E-H). To analyze whether new mature neurons were also formed following lesion, we performed double immunostaining for NeuN (mature neuron marker) and BrdU and labeled nuclei with ToPro. Few BrdU+ cells were also NeuN+ (Fig. 5I-L). Approximately 5 ± 1.5 BrdU+/NeuN+ neurons

from 6 sections spanning the lesion ($n=4$) were observed, which amounts to only 2% of the average number of migrating (Dcx^+) neuroblasts (~216, counted from day 2, 7, 15 and 30 lesion brains) indicating that few mature neurons are formed following lesion.

B) To ascertain that these neurons indeed originated from the SVZ, GFP expressing lentiviral injection was performed. Migrating neuroblasts were shown to penetrate into the cortex. In order to study the fate of these ectopic neuroblasts in the cortex, mice ($n=4$) were sacrificed three weeks after lentiviral injection. Occasional GFP^+/NeuN^+ mature neurons were observed (Fig. 5M-O), which confirmed that migrating immature neuroblasts have the capacity to form mature neurons in the cortex. In addition, GFP^+ long neuronal processes were present near the lesioned core (Fig. 5P, Q). 21 days following the injection procedure, $NG2^+/\text{GFP}^+$ mature oligodendrocytes were found within the corpus callosum (Fig. 5R-T). To avoid any possible misrepresentation of GFP^+/NeuN^+ mature neurons due to diffusion of virus from the site of injection, only cells far away from the site of injection were considered positive. Thus, new cells generated in the SVZ/RMS in response to the aspiration lesion can migrate to the lesioned area and differentiate into glial cells and also sparingly into mature neurons.

4. Discussion

This study describes several major physiological changes that take place in the forebrain following aspiration lesion within the adult motor cortex. First, a transient, but significant increase in the progenitor cell proliferation in the SVZ was observed in both hemispheres with a concomitant increase in the neuronal progenitor cell population. Second, a large number of neuroblasts

migrated out of the RMS to the site of cortical lesion. This migration was not transient and persisted for at least 2 months following lesion. Third, blood vessels and astrocytes were an integral part of this migratory process where both assisted neuroblasts to reach the lesion site. Fourth, changes in the expression of the SDF-1/CXCR4 signaling pathway were concomitant with astrocyte-associated migration. Finally, we report here that many of the newly generated cells differentiated into astrocytes and oligodendrocytes, while few differentiated into mature neurons. Injection of GFP-expressing lentivirus unambiguously demonstrated that the SVZ is indeed the source of these neurons migrating ectopically to the cortex.

4.1 Cortical lesion stimulates SVZ cell proliferation

Previous reports on SVZ cell proliferation following cortical lesion are limited and often contradictory. Several previous studies using different lesion models (for example, fluid-percussion Injury, controlled cortical impact and focal acute injury) demonstrated that proliferation in the SVZ is increased following cortical lesion (Chirumamilla et al., 2002; Chen et al., 2003; Ramaswamy et al., 2005; Blizzard et al., 2011). On the contrary, using aspiration lesion in mice, Goings et al., (2002) reported a biphasic decrease in the number of BrdU+ in the ipsilateral SVZ and that the reduction was found to be significant between 6 hrs and day 3, and again from day 25 to day 35. This apparent discrepancy might arise from differences in lesion models. However, using a similar aspiration lesion model we show that there is indeed a significant transient increase in cell proliferation in the SVZ following cortical aspiration lesion that peaks at day 7. Our results, thus, confirms lesion-induced augmentation in the SVZ proliferation and refutes any possible discrepancy

due to difference in lesion model. Moreover, proliferation increase was also observed in the contralateral SVZ as also reported previously (Chen et al., 2003; Masuda et al., 2007).

Barring few exceptions little is known about the changes in the expression pattern of factors that may control SVZ proliferation following cortical injury. In rats, aspiration lesion enhances expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in layer VIb neurons (Gomez-Pinilla and Cotman, 1992) and of epidermal growth factor (EGF) in the SVZ, and near the lesion area, but no change in the expression of the corresponding receptors (EGFr, FGFr) was observed (Sundholm-Peters et al., 2005). Expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is also increased after compact cortical impact injury (Yang et al., 1996). Sonic hedgehog (Shh) level is transiently increased in the cortex after cortical freeze injury and leads to reactive-gliosis (Amankulor et al., 2009).

Ambiguity also exists in the current knowledge on lesion-induced neurogenesis in the SVZ. In a previous report, 25 days after aspiration lesion, an increased expression of PSA-NCAM in the SVZ raises the possibility of a delayed neurogenesis (Goings et al., 2002). However, in another study, 15 days after aspiration lesion, BrdU+/Dcx+ cells were not reported to increase significantly in the SVZ (Sundholm-Peters et al., 2005). In our study, 7days after lesion, when the SVZ proliferation reached its peak, we observed a significant increase in the number of BrdU+/Dcx+ cells in the SVZ. This clearly indicates an increase in the post-lesion SVZ neurogenesis, possibly contributing to the cells migrating to the lesion area.

4.2 Neuroblasts emigrate from the SVZ into the area of cortical injury

Despite a majority of neuroblasts migrating towards the OB, a large number moved out of the RMS and navigated to the lesioned area. Ectopic migration started 2 days post-lesion, indicating a short delay in initiating this process. Although most of these ectopic cells were initially found either in the corpus callosum or in the deep layer of cortex, with time they were distributed throughout the cortical mantle and later predominantly localized near the lesioned area. This migration appeared to be persistent since even after 2 months of lesion, Dcx+ neuroblasts could still be found in the cortex. We observed that, unlike in the RMS, ectopic neuroblasts were predominantly single. Only few cell clusters were seen in the corpus callosum, but never in the cortical mantle. PSA-NCAM is necessary for chain migration and removal of the PSA moiety reduces the compactness of the chain (Chazal et al., 2000). We observed that the individual ectopic cells in the cortex expressed low to non-detectable levels of PSA-NCAM, while the ectopic cell clusters near the SVZ/RMS, expressed high level of PSA-NCAM (supplementary figure S1D-F). Downregulation (or absence) of PSA-NCAM in the neuroblasts may influence their individual radial migration towards the injury.

4.3 Interaction between migrating new neurons and host

In animal models of cerebral ischemia, new neurons from the SVZ migrate to the striatum (Arvidsson et al., 2002; Jin et al., 2003). Regulation of this ectopic migration appears to involve multiple factors. In ischemia, ectopic neuroblast migration is guided by blood vessels (Thored et al., 2007; Kojima et al., 2010). In different cortical lesion models, although ectopic migration has been reported, what regulates this process has not been studied thoroughly (Ramaswamy et al., 2005; Sundholm-Peters et al., 2005; Faiz et al., 2008).

We show here that blood vessels reorganize directing to the site of injury after lesion and a significant proportion of the migrating neuroblasts use them as 'railroads' and remain closely associated with these reorganized vessels. Interaction between laminin, a major extracellular matrix component, and its receptor $\alpha 6\beta 1$ integrin (expressed by SVZ neural precursors) may controls such migration, as blocking of $\alpha 6\beta 1$ integrin was shown to inhibit association of neural progenitors with blood vessels (Shen et al., 2008). In addition, blood vessel-derived BDNF can regulate migration through interaction with its receptor p75NTR, expressed by neuroblasts (Snappyan et al., 2009).

In the developing brain, SDF-1/CXCR4 signaling regulates migration of cerebellar granule cells (Zhu et al., 2009) and dentate granule cells of the hippocampus (Bagri et al., 2002). CXCR4 is expressed both in neurons (Bajetto et al., 1999) and in astrocytes (Ohtani et al., 1998). Moreover, CXCR4 is expressed by all three major cell types (type A, B and C) of the SVZ (Kokovay et al., 2010). Here, we have shown that 25% of ectopic neuroblasts migrate along reactive astrocytes. High expression of both CXCR4 and SDF-1 by astrocytes and CXCR4 by neuroblasts suggests a role of this signaling mechanism in astrocyte-assisted migration. Expression of both SDF-1 and CXCR4 by astrocytes indicates that an autocrine mechanism may regulate reactive astrocyte migration towards the lesioned area while a paracrine process, wherein secreted SDF-1 in the cortex is perceived by CXCR4-expressing neuroblasts, possibly regulates their attachment on the astrocyte and subsequent migration. In traumatic brain injury, a temporal relation between neural progenitors and SDF-1/CXCR4 expression was studied, where SDF-1 leakage was observed near the damaged area

following injury (Itoh et al., 2009). In addition, CXCR4 expression was increased only in Sox2-positive cells, but not in GFAP-positive astrocytes. However, the significance of such change of expression on neuroblast migration was not previously explored. In our study, AMD3100-mediated blocking of SDF-1/CXCR4 signaling along with a significant reduction in the proportion of astrocyte-assisted migration substantiates the hypothesis of a possible paracrine interaction. Shh expression is also induced in astrocytes after lesion (Amankulor et al., 2009) and therefore, there is potentially a synergistic role of Shh and SDF-1 signaling mechanisms in chemoattraction of neuroblasts. A significant number of neuroblasts migrating without any association indicate involvement of other as yet unidentified mechanisms regulating this process.

Post lesion, upregulation of secreted factors in the cortex and their receptors in the SVZ progenitors may regulate ectopic migration. Reelin upregulation around the lesion core within 1 day after lesion suggests its involvement in the initiation of such migration. In demyelination lesion, Reelin acts as a chemokinetic factor and regulate detachment of neuroblasts from the RMS and their dispersal into the corpus callosum (Courtes et al., 2011). This helps other chemokines to mobilize cells to the affected region.

4.4 Migrating cells from the SVZ into the area of cortical injury differentiate into astrocytes, oligodendrocytes and mature neurons

Using a long term BrdU assay we show that most of the BrdU+ cells present around the lesion co-express GFAP, many co-express Olig2 and a few BrdU+ cells express NeuN. After injection of lentivirus encoding GFP into the SVZ of lesioned animals, few NeuN+/GFP+ cells with long processes were seen near

the injury area. This strongly suggests that neuroblasts generated in the SVZ and migrating into the area of cortical injury have the ability to differentiate into mature neurons, although in relatively low number. These results are in agreement with previous studies in a controlled cortical impact (CCI) injury model showing that most of the progenitors within cortical lesion area differentiate into mature astrocytes (Kernie et al., 2001), while mature neurons were found only occasionally (Salman et al., 2004). Taken together, these results indicate that the microenvironment of the mature cortex may favor glial differentiation. This conclusion is further strengthened by a previous observation where purified SVZ neuronal precursors, when transplanted into the motor cortex, predominantly differentiated into oligodendrocytes and astrocytes (Seidenfaden et al., 2006). This fate switch may occur possibly at the end of migration when cells reach their destination and start downregulating the neuroblast marker Dcx. It is to be noted, however, in demyelination lesion, gilal protein expression by SVZ neuroblasts indicates that the immature cells already harbor this switch signal (Jablonska et al., 2010). Following lesion, changes in the local environment may also induce the glial fate. We observed a transient upregulation of Olig2 in the cortex as also reported by Buffo et al. (2005). Transient upregulation of Shh in the cortex (Amankulor et al., 2009) may trigger oligodendrocyte differentiation and suppress mature neuron formation following lesion.

The origin of newly generated mature neurons in the cortex following injury is controversial. Few studies indicated that new neurons are generated in the cortex in response to degeneration of layer VI cortico-thalamic projection neurons (Magavi et al., 2000) and following infrared-laser lesion of the rat

visual cortex (Sirco et al., 2009). Our GFP-encoding lentivirus injection into the SVZ provides direct evidence that the SVZ is indeed the source of the ectopic neurons that we found in the area of cortical injury. Thus, we convincingly demonstrated that the SVZ-derived neuroblasts can differentiate into mature neurons and can also extend long processes near the lesion core.

Unlike rodents, SVZ proliferation in human is reduced drastically with age (Sanai et al., 2011) and only few neuroblasts originate from the anterior ventral SVZ (Wang et al., 2011). In addition, neuronal turnover in the OB is minimal or none at all (Bergmann et al., 2012). However, there are evidences of ischemia induced increased neurogenesis in the SVZ (Makas et al., 2006, Marti-Fabregas et al., 2010) in human. Similarly, TBI also increases neurogenesis in human cortex (Zheng et al., 2011). Therefore, analysis of lesion-induced changes in experimental mouse model finds relevance with a possibility of extrapolating these observations in human conditions to design repair strategies following trauma or in neurodegenerative diseases.

In conclusion, this study describes extensively the post-lesion changes in the cortex and in the SVZ. Besides providing strong evidence of SVZ proliferation and neurogenesis, this study sheds light on mechanistic aspects on the ectopic migration of SVZ neuroblasts. Multiple modes of migration through the injured cortex point to the involvement of several other yet unknown mechanisms in addition to SDF-1/CXCR4 signaling that regulates astrocyte-assisted migration. GFP transduction in the SVZ provided evidence of SVZ-derived mature neurons in the injured cortex. These findings are of importance as they are the first detailed description of cell proliferation,

migration and differentiation following injury, which constitute a mandatory step in the field of endogenous brain repair processes.

Acknowledgements

This work was funded by grants from the Institut de Recherche sur la Moelle épinière et sur l'Encéphale (IRME), and the Agence Nationale de la Recherche ANR-09-MNPS-027-01 (to A.G) and the CPER 5. B.S. is a postdoctoral fellow of ANR. We thank Dr. André Goffinet for Reelin antibody, M. Francheteau for technical assistance and staffs of Image'UP platform (University of Poitiers).

References

- Altman, J., Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319-336.
- Amankulor, N.M., Hambardzumyan, D., Pyonteck, S.M., Becher, O.J., Joyce, J.A., Holland, E.C., (2009). Sonic hedgehog pathway activation is induced by acute brain injury and regulated by injury-related inflammation. *J. Neurosci.* 29, 10299-10308.
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., Lindvall, O., (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat. Med.* 8, 963-970.
- IV. Bagri, A., Gurney, T., He, X., Zou, Y.R., Littman, D.R., Tessier-Lavigne, M., Pleasure, S. J. (2002). The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development.* 129, 4249-4260.
- V. Bajetto, A., Bonavia, R., Barbero, S., Piccioli, P., Costa, A., Florio, T., Schettini, G. 1999. Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. *J. Neurochem.* 73, 2348-2357.

Bergmann, O., Liebl, J., Bernard, S., Alkass, K., Yeung, M.S., Steier, P., Kutschera, W., Johnson, L., Landén, M., Druid, H., Spalding, K.L., Frisén, J. (2012). The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron*. 74, 634-639.

Blizzard, C.A., Chuckowree, J.A., King, A.E., Hosie, K.A., McCormack, G.H., Chapman, J.A., Vickers, J.C., Dickson, T.C. (2011). Focal damage to the adult rat neocortex induces wound healing accompanied by axonal sprouting and dendritic structural plasticity. *Cereb. Cortex*. 21, 281-291.

Buffo, A., Vosko, M.R., Erturk, D., Hamann, G.F., Jucker, M., Rowitch, D., Gotz, M. (2005). Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: Implications for neuronal repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102, 18183-18188.

Carbonell, W.S., Murase, S., Hoewitz, A.F., Mandell, J.W. (2005). Migration of perilesional microglia after focal brain injury and modulation by CC chemokine receptor 5: an *in situ* time-lapse confocal imaging study. *J. Neurosci.* 25, 7040-7047.

Chazal, G., Durbec, P., Jankovski, A., Rougon, G., Cremer, H. (2000). Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *J. Neurosci.* 20, 1446-1457.

Chen, X-H., Iwata, A., Nonaka, M., Browne, K.D., Smith, D.H. (2003). Neurogenesis and glial proliferation persist for at least one year in the subventricular zone following brain trauma in rats. *J. Neurotrauma* 20, 623-631.

Chen, Y., Swanson, R.A. (2003). Astrocytes and Brain Injury. *J. Cereb. Blood Flow & Metab.* 23, 137-149.

Chirumamilla, S.S., Sun, D., Bullock, M.R., Colello, R.J. (2002). Traumatic brain injury induced cell proliferation in the adult mammalian central nervous system. *J. Neurotrauma*. 19, 693-703.

Consiglio, A., Gritti, A., Dolcetta, D., Follenzi, A., Bordignon, C., Gage, F.H., Vescovi, A.L., Naldini, L. (2004). Robust *in vivo* gene transfer into adult mammalian neural stem cells by lentiviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 14835-14840.

Courtès, S., Vernerey, J., Pujadas, L., Magalon, K., Cremer, H., Soriano, E., Durbec, P., Cayre, M. (2011). Reelin controls progenitor cell migration in the healthy and pathological adult mouse brain. *PLoS One.* 6, e20430.

Decressac, M., Wright, B., Tyers, P., Gaillard, A., Barker, R. A. (2010). Neuropeptide Y modifies the disease course in the R6/2 transgenic model of Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 226, 24-32.

VI. Dizon, M.L., Shin, L., Sundholm-Peters, N.L., Kang, E., Szele, F.G. (2006). Subventricular zone cells remain stable in vitro after brain injury. *Neuroscience.* 142, 717-725.

Doetsch, F., García-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* 17, 5046-5061.

Faiz, M., Acarin, L., Villapol, S., Schulz, S., Castellano, B., Gonzalez, B. (2008). Substantial migration of SVZ cells to the cortex results in the generation of new neurons in the excitotoxically damaged immature rat brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 38, 170-182.

Frotscher, M. (1997). Dual role of Cajal–Retzius cells and reelin in cortical development. *Cell Tissue Res.* 290, 315-322.

VII. Gage, F.H., Kempermann, G., Palmer, T.D., Peterson, D.A., Ray, J. (1998). Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J. Neurobiol.* 36, 249-266.

Goings, G.E., Wibisono, B.L., Szele, F.G. (2002). Cerebral cortex lesions decrease the number of bromodeoxyuridine positive subventricular zone cells in mice. *Neurosci. Letts.* 329, 161-164.

VIII. Gómez-Pinilla, F., Cotman, C.W. (1992). Transient lesion-induced increase of basic fibroblast growth factor and its receptor in layer VIb (subplate cells) of the adult rat cerebral cortex. *Neuroscience.* 49, 771-780.

Grubb, M.S., Nissant, A., Murray, K., Lledo, P.M. (2008). Functional maturation of the first synapse in olfaction: development and adult neurogenesis. *J. Neurosci.* 28, 2919-2932.

IX. Hagino, S., Iseki, K., Mori, T., Zhang, Y., Hikake, T., Yokoya, S., Takeuchi, M., Hasimoto, H., Kikuchi, S., Wanaka, A. (2003). Slit and glyican-1 mRNAs are coexpressed in the reactive astrocytes of the injured adult brain. *Glia.* 42, 130-138.

Hoglinger, G.U., Rizk, P., Muriel, M.P., Duyckaerts, C., Oertel, W.H., Caille, I., Hirsch, E.C. (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat. Neurosci.* 7, 726-735.

Imitola, J., Raddassi, K., Park, K.I., Mueller, F.J., Nieto, M., Frenkel, D., Li, J., Sidman, R.L., Walsh, C.A., Snyder, E.Y., Khouri, S.J. (2004). Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 18117-18122.

Itoh, T., Satou, T., Ishida, H., Nishida, S., Tsubaki, M., Hashimoto, S., Ito, H. (2009). The relationship between SDF-1alpha/CXCR4 and neural stem cells appearing in damaged area after traumatic brain injury in rats. *Neurol. Res.* 31, 90-102

Jablonska, B., Aguirre, A., Raymond, M., Szabo, G., Kitabatake, Y., Sailor, K.A., Ming, G., Song, H., Gallo, V. (2010). Chordin induced lineage plasticity of adult SVZ neuroblasts after demyelination. *Nat. Neurosci.* 13, 541-550.

Jin, K., Sun, Y., Xie, L., Peel, A., Mao, X.O., Batteur, S., Greenberg, D.A. (2003). Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 171-189.

Kaneko, N., Marín, O., Koike, M., Hirota, Y., Uchiyama, Y., Lu, Q., Tessier-Lavigne, M., Alvarez-Buylla, A., Okano, H., Rubenstein, J.L., Sawamoto, K. (2010). New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron.* 67, 213-223.

Kernie, S.G., Erwin, T.M., Parada, L.F. (2001). Brain remodeling due to neuronal and astrocytic proliferation after controlled cortical injury in mice. *J. Neurosci. Res.* 66, 317- 326.

Kojima, T., Hirota, Y., Ema, M., Takahashi, S., Miyoshi, I., Okano, H., Sawamoto, K. (2010). Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells.* 28, 545-554.

Kokovay, E., Goderie, S., Wang, Y., Lotz, S., Sun, Y., Roysam, B., Shen, Q., Temple, S. (2010). Adult SVZ lineage cells home to and leave the vascular niche via differential responses to SDF1/CXCR4 signaling. *Cell Stem Cell.* 6, 163-173.

X. Lois, C., Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science.* 264, 1145-1148.

Lois, C., García-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science.* 271, 978-981.

Luskin, M.B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from forebrain subventricular zone. *Neuron.* 11, 173-189.

Magavi, S.S.P., Leavitt, B.R., Macklis, J.D. (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature.* 405, 951-955.

Macas, J., Nern, C., Plate, K.H., Momma, S. (2006). Increased Generation of Neuronal Progenitors after Ischemic Injury in the Aged Adult Human Forebrain. *J. Neurosci.* 26, 13114–13119.

XI. Martí-Fàbregas, J., Romaguera-Ros, M., Gómez-Pinedo, U., Martínez-Ramírez, S., Jiménez-Xarrié, E., Martí-Vilalta, J.L., García-Verdugo, J.M. (2010). Proliferation in the human ipsilateral subventricular zone after ischemic stroke. *Neurology.* 74, 357-365.

XII. [Masuda, T., Isobe, Y., Aihara, N., Furuyama, F., Misumi, S., Nishino, H., Hida, H.] (2007). Increase in neurogenesis and neuroblast migration after a small intracerebral hemorrhage in rats. *Neurosci. Lett.* 425, 114-119.

Ohtani, Y., Minami, M., Kawaguchi, N., Nishiyori, A., Yamamoto, J., Takami, S., Satoh, M. (1998). Expression of stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 chemokine receptor mRNAs in cultured rat glial and neuronal cells. *Neurosci. Lett.* 249, 163-166.

Pesold, C., Impagnatiello, F., Pisu, M.G., Uzunov, D.P., Guidotti, A., Caruncho, H.J. (1998). Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 3221-3226.

Ramaswamy, S., Goings, G.E., Soderstrom, K.E., Szele, F.G., Kozlowski, D.A. (2005). Cellular proliferation and migration following a controlled cortical impact in the mouse. *Brain Res.* 1053, 38-53.

Rice, A.C., Khaldi, A., Harvey, H.B., Salman, N.J., White, F., Fillmore, H., Bullock, M.R. (2003). Proliferation and neuronal differentiation of mitotically active cells following traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 183, 406-417.

Rodriguez, J.J., Jones, V.C., Verkhratsky, A. (2009). Impaired cell proliferation in the subventricular zone in an Alzheimer's disease model. *Neuroreport.* 20, 907-912.

XIII. Rubin, J.B., Kung, A.L., Klein, R.S., Chan, J.A., Schmidt, K., Kieran, M.W., Luster, A.D., Segal, R.A. (2003). A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100, 13513-13518.

Saha, B., Jaber, M., Gaillard, A. (2012). Potentials of endogenous neural stem cells in cortical repair. *Front. Cell. Neurosci.* 6: article 14.

Salman, H., Ghosh, P., Kernie, S.G. (2004). Subventricular zone neural stem cells remodel the brain following traumatic injury in adult mice, *J. Neurotrauma* 21, 283-292.

Sanai, N., Nguyen, T., Ihrie, R.A., Mirzadeh, Z., Tsai, H.H., Wong, M., Gupta, N., Berger, M.S., Huang, E., Garcia-Verdugo, J.M., Rowitch, D.H., Alvarez-Buylla, A. (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*. 478, 382-386.

Seidenfaden, S., Desoeuvre, A., Bosio, A., Virard, I., Cremer, H. (2006). Glial conversion of SVZ-derived committed neuronal precursors after ectopic grafting into the adult brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 32, 187-198.

XIV. Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Chuang, S.M., Goderie, S.K., Roysam, B., Temple, S. (2008). Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cells*. 3, 289-300.

Sirko, S., Neitz, A., Mittmann, T., Horvat-Bröcker, A., von Holst, A., Eysel, U.T., Faissner, A. (2009). Focal laser-lesions activate an endogenous population of neural stem/progenitor cells in the adult visual cortex. *Brain*. 132, 2252-2264.

XV. Snappyan, M., Lemasson, M., Brill, M.S., Blais, M., Massouh, M., Ninkovic, J., Gravel, C., Berthod, F., Götz, M., Barker, P.A., Parent, A., Saghatelian, A. (2009). Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J. Neurosci.* 29, 4172-4188.

Stumm, R., Hollt, V. (2007). CXC chemokine receptor 4 regulates neuronal migration and axonal pathfinding in the developing nervous system: implications for neuronal regeneration in the adult brain. *J. Mol. Endocrinol.* 38, 377-382.

Sundholm-Peters, N.L., Yang, H.K., Goings, G.E., Walker, A.S., Szele, F.G. (2005). Subventricular zone neuroblasts emigrate toward cortical lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 1089-1100.

Szele, F.G., Chesselet, M.F. (1996). Cortical lesions induce an increase in cell number and PSA-NCAM expression in the subventricular zone of adult rats, *J. Comp. Neurol.* 368, 439-454.

Thored, P., Wood, J., Arvidsson, A., Cammenga, J., Kokaia, Z., Lindvall, O. (2007). Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization After Stroke. *Stroke.* 38, 3032-3039.

XVI. Wang, C., Liu, F., Liu, Y.Y., Zhao, C.H., Wang, L., Zhang, J., Wei, B., Zhang, Y., Chen, R., Song, H., Yang, Z. (2011). Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res.* 21, 1534-1550.

Whitman, M.C., Fan, W., Rela, L., Rodriguez-Gil, D.J., Greer, C. A. (2009). Blood vessels form a migratory scaffold in the rostral migratory stream. *J. Comp. Neurol.* 516, 94-104.

XVII. Yang, K., Perez-Polo, J.R., Mu, X.S., Yan, H.Q., Iwamoto, Y., Liu, J., Dixon, C.E., Hayes, R.L. (1996). Increased expression of brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 mRNA in rat brain after cortical impact injury. *J. Neurosci. Res.* 44, 157-164.

XVIII. Zheng, W., Zhuge, Q., Zhong, M., Chen, G., Sho, B., Wang, H., Mao, X., Xie, L., Jin, K. (2011). Neurogenesis in Adult Human Brain after Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma.* doi:10.1089.

Zhu Y, Matsumoto T, Mikami S, Nagasawa T, Murakami F. (2009). SDF1/CXCR4 signalling regulates two distinct processes of precerebellar neuronal migration and its depletion leads to abnormal pontine nuclei formation. *Development.* 136, 1919-1928.

Figure legends

Figure 1. Cortical lesion stimulates SVZ cell proliferation and neurogenesis. Photomicrographs of BrdU+ cells in the SVZ of control mice (A), and mice 7 (B), 30 (C) or 60 days (D) after cortical lesion. (E) Quantification of BrdU+ cell number in the SVZ at different times after lesion. (F,G) Double-

immunofluorescence confocal micrographs of BrdU (red) and Dcx (green) in the SVZ of control mice (*F*) and 7 days after cortical lesion (*G*). (*H*) Quantification of Dcx+/BrdU+ cell number in the SVZ of control mice and 7 days after cortical lesion. LV: lateral ventricle, St: striatum. Scale bars: (*A-D, F, G*) 200 μ m, (*A-D* inset) 90 μ m, (*F, G* inset) 20 μ m.

Figure 2. Ectopic migration of Dcx+ neuroblasts from the SVZ to the cortical lesion site. Schematics of sagittal (*A*) and coronal (*E*) view of the mouse brain showing migration of neuroblasts from the SVZ to the lesion area. Parasagittal view of photomicrographs of Dcx+ cells in the RMS of control animals (*B*), and after lesion (*C*). Dcx+ cells were seen either in cluster (*D*, asterisk) or individually (*D*, arrowhead). Low magnification photomicrograph shows the extent of lesion (*F*). At various time points after lesion cells migrated through different regions of the cortical mantle (boxed in *E*). Dcx+ immunostaining of ectopic neuroblasts after 2 days (*G*), 7 days (*H*), 15 days (*J*) and 30 days (*L*). High magnification confocal micrographs of Dcx+ neuroblasts showing different cellular morphology at different stages of migration (*I, K, M*; boxed area in *H, J* and *L* respectively). CC= corpus callosum, Cx= cortex, L= lesion, V= ventricle. Scale Bars: (*B, C, F, G, H, J, L*) 200 μ m, (*D, I, K, M*) 30 μ m.

Figure 3. Changes in cortical microenvironment assist neuroblast migration after lesion. CD31 immunostaining of control intact cortex (*A*) and lesioned cortex at different times after injury (*B-D*). Double immunofluorescence confocal micrograph of Dcx (green) and CD31 (red) at day 7 (*E-G*) and day 15 (*H*). Similarly, double-immunostaining of astrocytes (blue) and neuroblasts (green) after 7 days of lesion (*I, J*). (*K, L* asterisk) Migration of neuroblasts (green) without any association. GFP immunostaining of brain sections after 8

days of lentivirus injection (dpi) into the SVZ/RMS (*M*). In the cortex, GFP+ cells (green) co-express Dcx (red) (boxed in *N*). GFP+ neuroblasts also showed association with either blood vessels (*O*) or astrocytes (*P*). Scale bars: (*A-D*) 250 μ m, (*E, H*) 50 μ m, (*F, G*) 16 μ m, (*I, J, O, P*) 20 μ m, (*K, L*) 30 μ m, (*N*) 80 μ m, (*N* inset) 40 μ m, (*M*) 100 μ m, (*M* inset) 50 μ m.

Figure 4. Expression pattern of SDF-1 and its receptor CXCR4 in the cortex after lesion. SDF-1 expression pattern in the cortex of the control mice (*A*) and 3 days after lesion (*B*). Photomicrograph of CXCR4 expression in the non-lesioned cortex (*C*) and near the lesion core (*D*). Confocal micrographs of double-immunostained sections with GFAP (red) and SDF-1 (Green) (*E*) and GFAP (red) and CXCR4 (green) (*F*). Near the lesion, Reelin was co-expressed with CXCR4 (*G*) and some NeuN+ cells co-expressed CXCR4 (*H-H'*). Double-immunostaining of Dcx (red) and CXCR4 (green) in the neuroblasts in the RMS (*H*) and after exiting the RMS (*I*). Quantification of changes in the cell association following administration of CXCR4-blocker AMD3100 (*J*). Scale Bars: (*A-D*) 250 μ m, (*E-G, I*) 50 μ m, (*H*) 20 μ m.

Figure 5. Neuroblasts in the cortex differentiate into glia and neurons. One month after cortical lesion, overlapping expression of BrdU (red) and GFAP (green) near the lesion core (*A*). GFAP+ astrocytes (green) co-expressed BrdU (red) (*B-D*) in this area. Olig2-expressing cells (green) also co-labeled BrdU (red) adjacent to the lesioned cortical areas (*E-H*). In the cortex, some BrdU+ cells (red) expressed mature neuronal marker NeuN (green) (*I-L*). GFP+ cells also co-labeled with NeuN (red) after 21 days of lentiviral injection (*M-O*). GFP+ neuronal processes near the lesion core (*P, Q*). NG2+/GFP+ mature oligodendrocytes (*R-T*) after 21 days of GFP injection. Scale bars: (*A*,

C) 150 µm, (*B-D, M-O*) 15 µm, (*F-H*) 20 µm, (*I-L*) 8 µm, (*P, Q*) 50 µm, (*R-T*) 20 µm.

Supplementary figure1. Doublecortin expressing ectopic neuroblasts in the cortex also express ToPro indicating these cells contain soma (compare *A-C*). Ectopic neuroblasts when remain in cluster near the RMS, express both Dcx and PSA-NCAM (*D-F*). However, single isolated neuroblasts downregulate PSA-NCAM. Scale bars: (*A-C*) 20 µm, (*D-F*) 25 µm.

Supplementary figure2. Expression of GFAP+ reactive astrocytes was upregulated in the cortex after lesion and maintained for at least 30 days (*A-D*). Reelin expression was increased transiently (*F, G*) compared to control (*E*), but diminished by 3 weeks (*H*). Scale bars: (*A-D*) 200 µm, (*E-H*) 100 µm.

Figure: 1

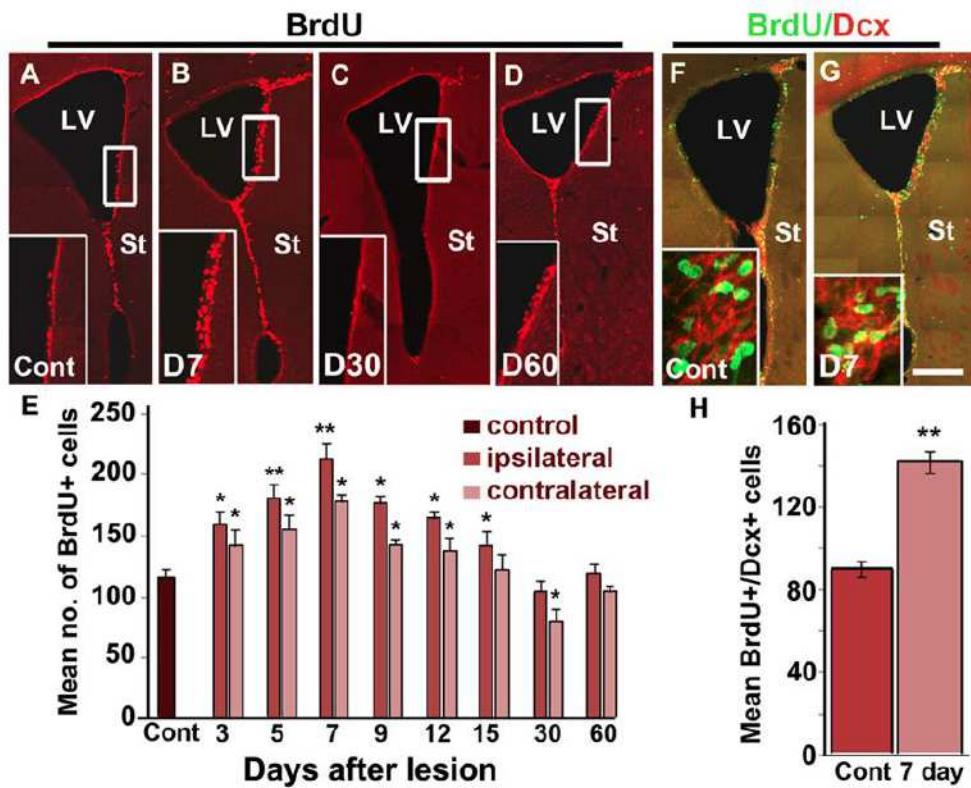


Figure 2

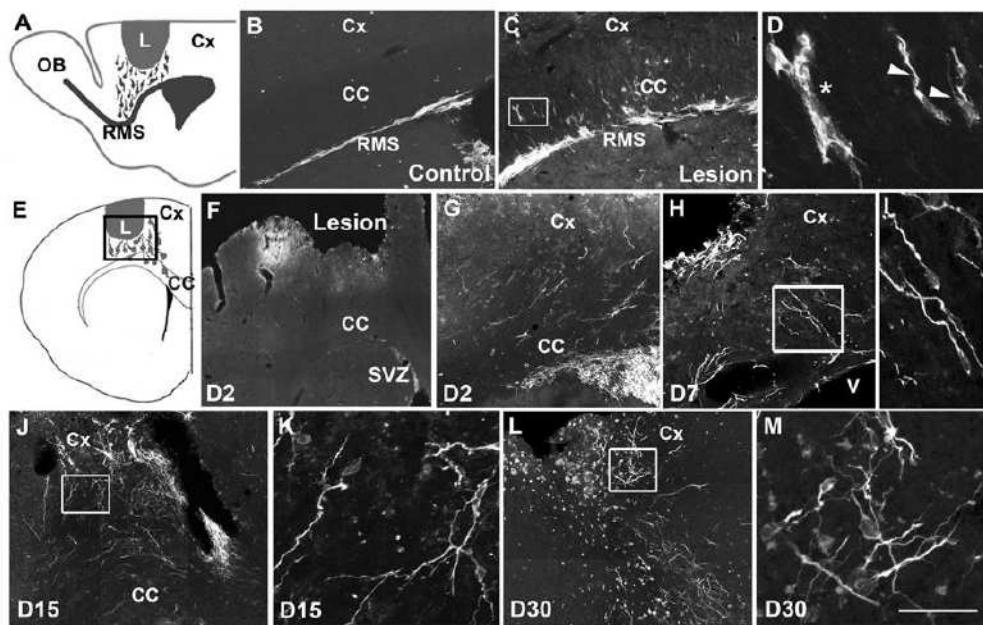


Figure: 3

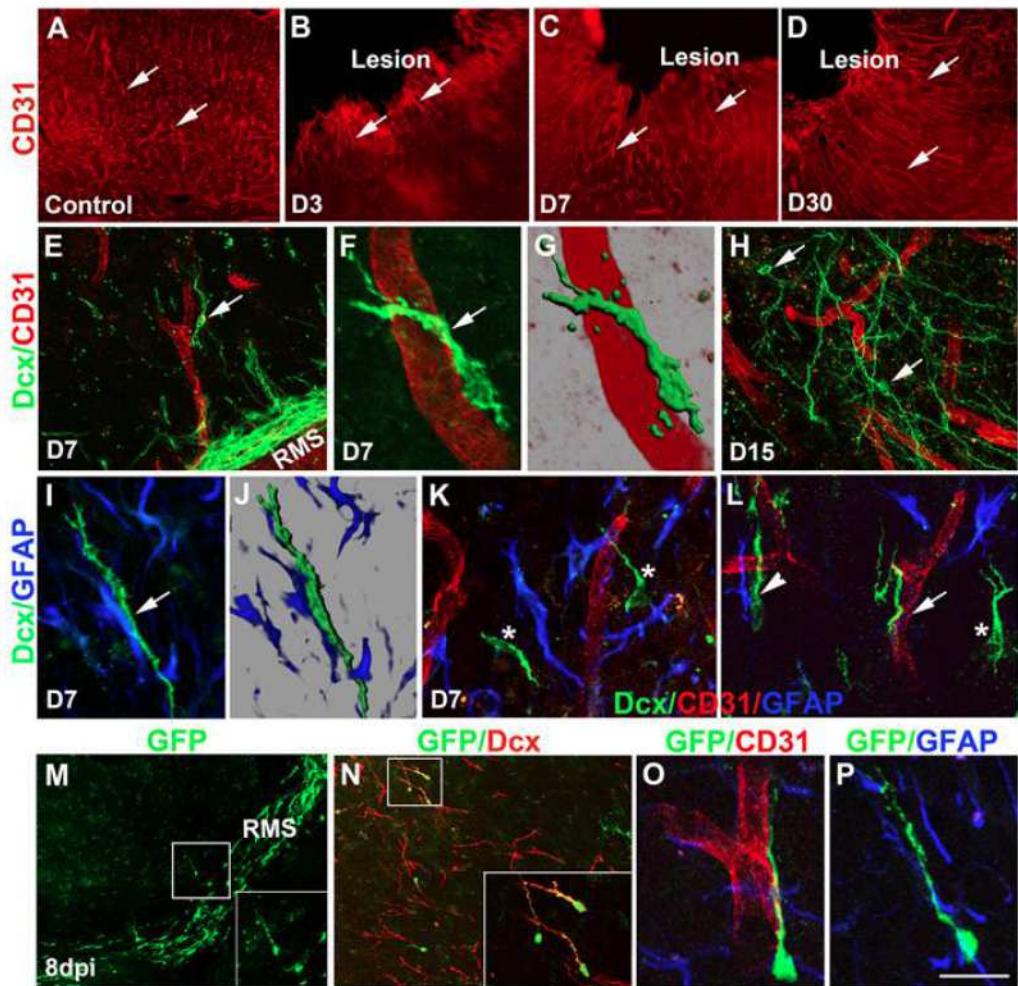


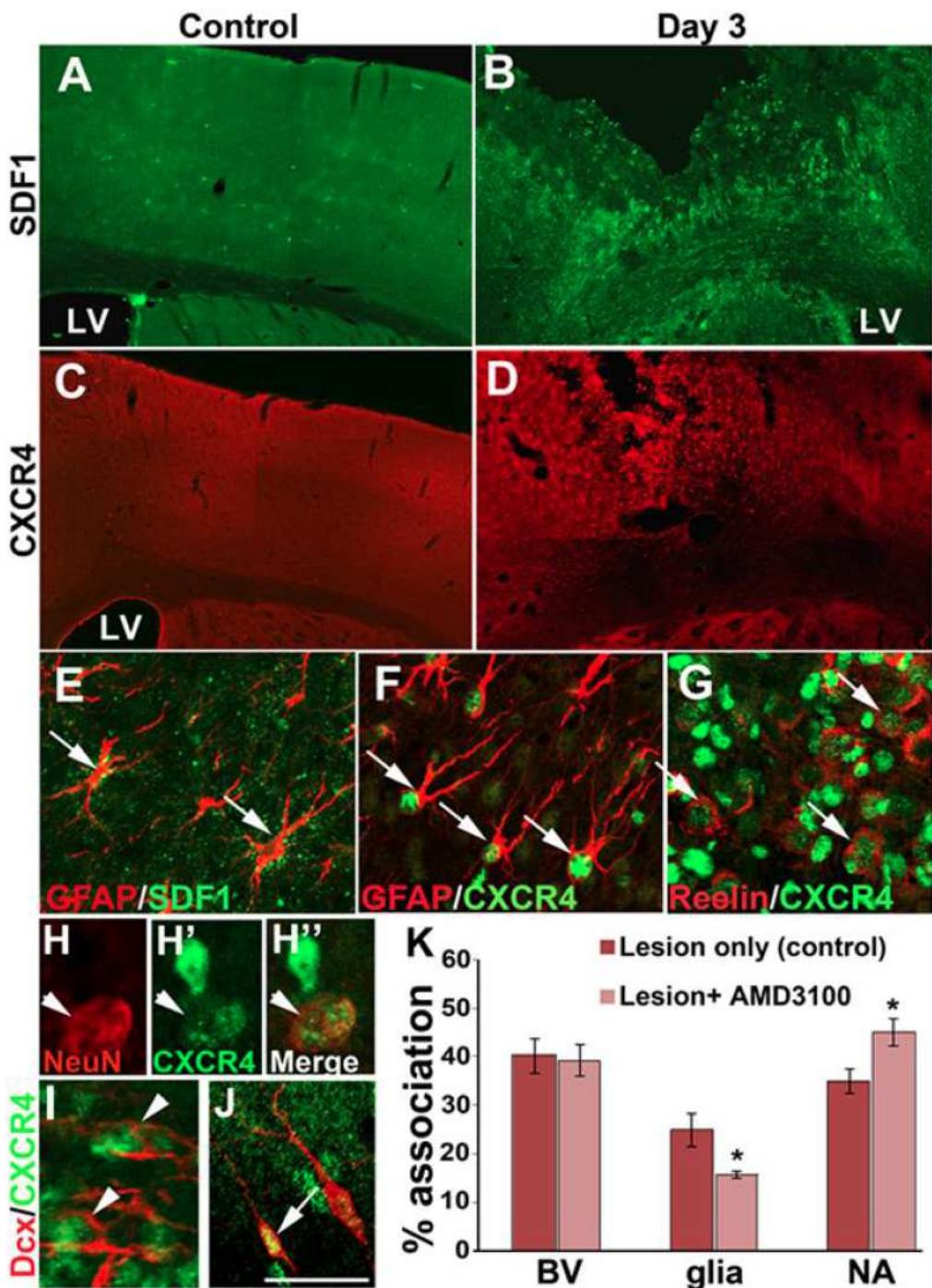
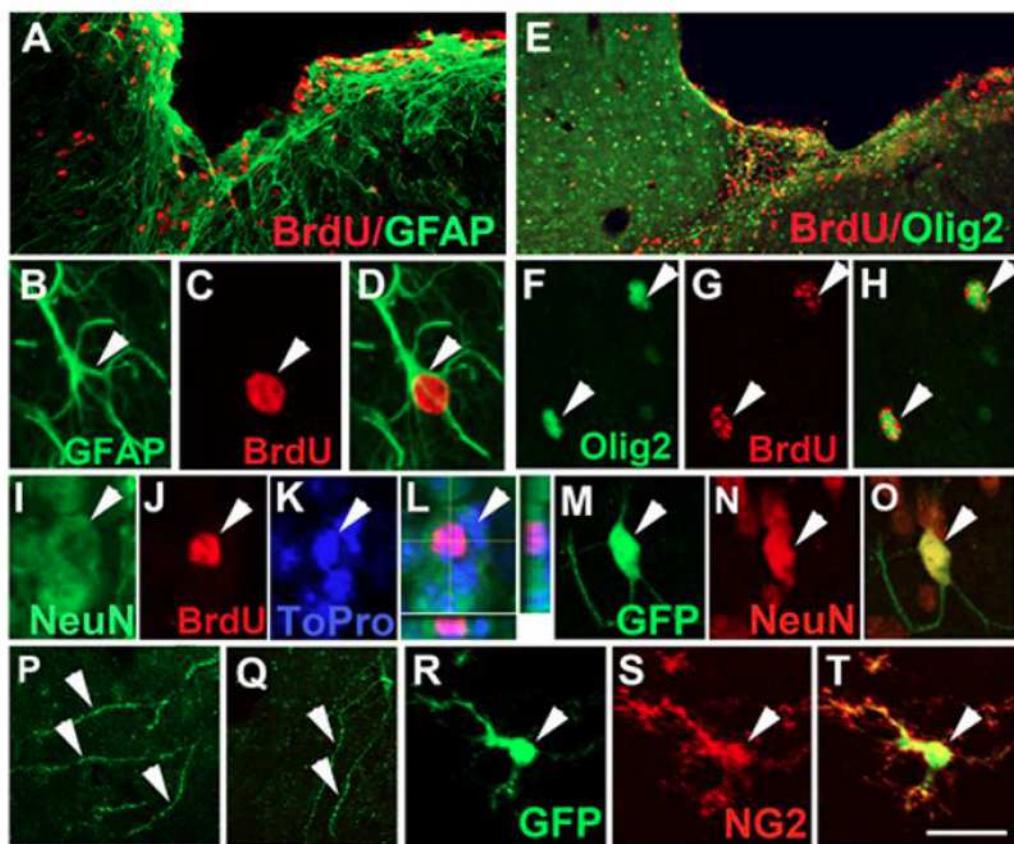
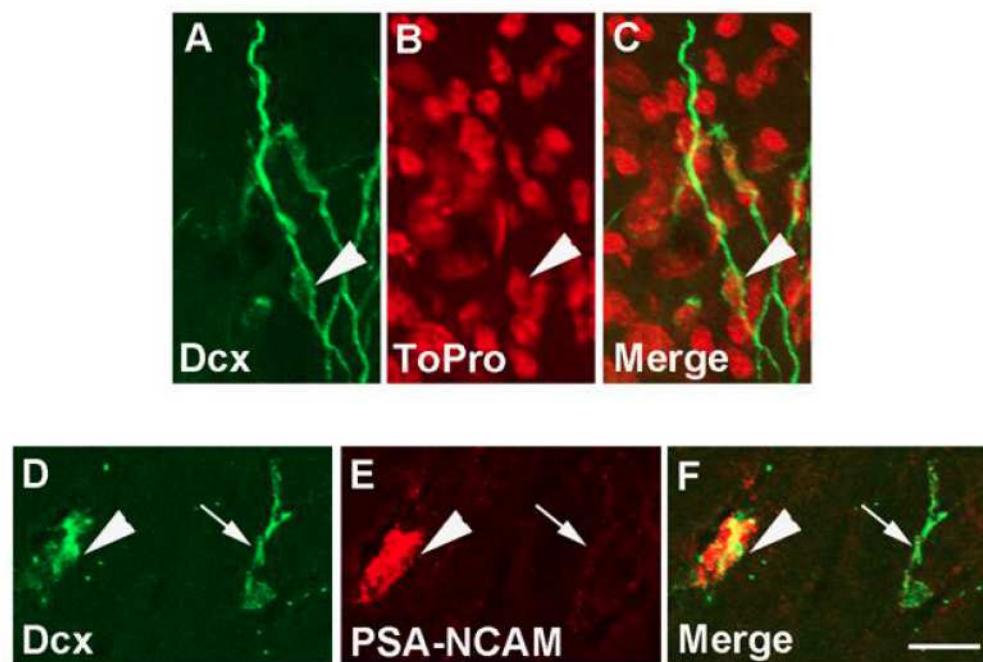
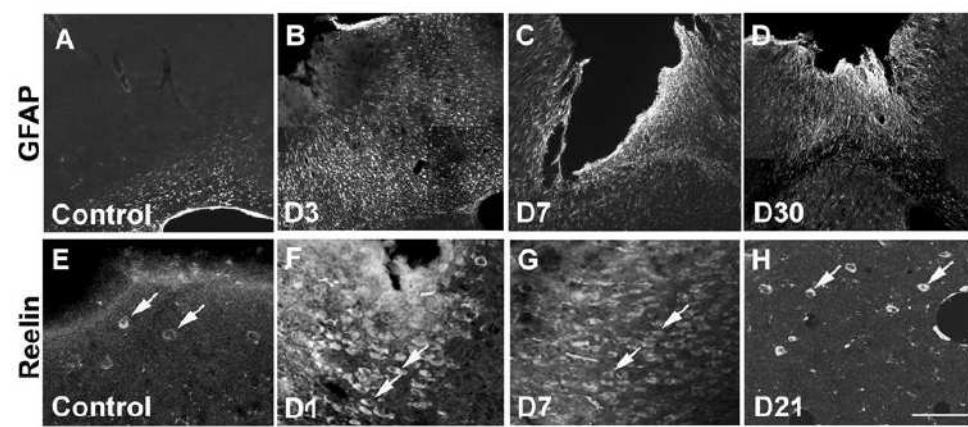
Figure: 4

Figure: 5

Supplementary Figure 1**Supplementary Figure 2**

DISCUSSION

Le système nerveux central mature a longtemps été considéré comme un système immuable et imperméable à la repousse axonale. Les perspectives thérapeutiques de remplacement cellulaire après une lésion d'origine traumatique ou neurodégénérative semblaient alors limitées. De nombreuses avancées majeures ces dernières décennies ont permis de remettre en question ce dogme. Parmi elles, la découverte de la persistance d'évènements neurogéniques dans le cerveau mammifère adulte (pour revue, Ming et Song, 2005) et la possibilité de rétablir des circuits lésés par transplantation chez l'adulte (Gaillard et al., 2007 ; Gaillard et al., 2009 ; Magavi et Lois., 2008 ; Thompson et al., 2009) laissent entrevoir de nouvelles perspectives dans le cadre de thérapies cellulaires visant à remplacer les neurones perdus.

L'objectif de nos travaux, effectués chez la souris, a donc été d'étudier le potentiel des stratégies de remplacement cellulaire dans les mécanismes de réparation du système nerveux central selon deux approches parallèles : l'apport exogène de cellules par transplantation et le recrutement des cellules souches endogènes de l'une des deux principales zones neurogéniques du cerveau, la SVZ.

Nous allons dans cette partie discuter dans un contexte général du potentiel réparateur qu'offrent ces deux stratégies et de leur éventuelle transposition à l'humain.

Potentiel thérapeutique des stratégies de remplacement cellulaire par transplantation neuronale

Comme nous l'avons vu en introduction de ce travail, la transplantation de cellules nerveuses pour compenser la mort cellulaire en conditions pathologiques a fait l'objet d'intenses recherches expérimentales, aboutissant même à certains succès avec leur application à l'humain dans le cadre d'essais cliniques. Différentes sources de cellules à transplanter ont été rapportées, et si l'avenir de la transplantation neuronale semble dorénavant porté par la possibilité de produire des neurones «à la carte» à partir de cellules souches par exemple, la transplantation de neurones embryonnaires permet encore de répondre à un certain nombre de questions fondamentales concernant aussi bien des mécanismes liés au développement qu'à la réparation cérébrale.

Nos deux premiers travaux ont été réalisés dans un modèle de transplantation de neurones embryonnaires après lésion par aspiration du cortex moteur chez l'adulte. Nous avons pour la première fois décrit de manière détaillée la composition cellulaire et le développement dans le temps de transplants de cellules embryonnaires après lésion corticale. En effet, nous avons montré que les cellules corticales d'origine motrice, prélevées au 14^e jour de vie embryonnaire puis transplantées dans le cortex moteur, exhibaient dans un premier temps des caractéristiques de neurones immatures, puis se différenciaient en neurones matures. Si l'organisation laminaire caractéristique du cortex moteur n'est pas proprement conservée, les cellules du transplant semblent tout de même présenter un certain niveau d'organisation. En effet, différentes populations neuronales, exprimant des facteurs de transcription spécifiques des différentes couches corticales, se regroupent en amas ou bandes. De plus, les neurones matures du transplant adoptent un phénotype cortical approprié puisqu'une majorité d'entre eux sont de type glutamatergique, et une minorité de type GABAergique. L'origine du transplant et sa composition cellulaire sont des variables dont dépend l'efficacité des transplants. Il a été démontré dans des modèles de transplantation hétérotopiques (par exemple, la transplantation de fragments embryonnaires du cortex visuel dans le cortex moteur ou la transplantation de neurones embryonnaires dopaminergiques du bulbe olfactif dans la substance noire) et homotopiques, la nécessité de transplanter des neurones dont la région d'origine correspond au site de transplantation (Barth and Stanfield, 1994 ; Frappé et al., 1999 ; Gaillard et al., 1994 ; Gaillard et al., 1998 ; Gaillard et al., 2009). De plus, la transplantation de neurones embryonnaires dopaminergiques du mésencéphale ventral dans le cadre du traitement de la maladie de Parkinson a montré que le sous-type neuronal utilisé doit être approprié. En effet, le mésencéphale ventral embryonnaire utilisé pour la transplantation contient deux populations de neurones dopaminergiques : les neurones A9 de la substance noire pars compacta, et les neurones A10 de l'aire tegmentale ventrale. Après transplantation, les neurones A10 projettent vers le cortex frontal, et seuls les neurones A9 nigraux sont capables d'innérer le striatum (pour revue, Lindvall et Björklund, 2004 ; Thompson et al., 2005). Pendant la corticogenèse, les différentes couches corticales s'établissent

selon une séquence temporelle précise : les neurones des couches profondes sont générés avant les neurones des couches superficielles. Il aurait été intéressant d'étudier si, après transplantation, les neurones embryonnaires corticaux se développent en respectant cette séquence. L'injection de 2-bromo-déoxyuridine à différents temps, couplée à des immunomarquages de marqueurs spécifiques des différentes couches corticales aurait permis de répondre à cette question.

Par ailleurs, l'analyse des projections développées par les neurones transplantés montre qu'ils permettent un rétablissement des voies lésées. Il aurait été intéressant, par injection stéréotaxique de traceurs rétrogrades couplée à des immunomarquages, d'analyser si le phénotype et l'identité laminaire des cellules transplantées projetant vers les différentes cibles étaient conservés.

Sur ce même modèle de lésion et transplantation, nous avons démontré qu'introduire un délai d'une semaine entre la lésion corticale et la transplantation de neurones embryonnaires avait un effet bénéfique sur le développement des neurones transplantés en termes de vascularisation, prolifération cellulaire, et du nombre de projections développées par les cellules transplantées. Il a été démontré dans un modèle de lésion par aspiration du cortex entorinal, que des facteurs neurotrophiques étaient sécrétés par les astrocytes autour du site de lésion et dans la cavité lésionnelle avec un pic à une semaine (Nieto-Sampedro et al., 1983). Aussi, dans un modèle de lésion de la moelle épinière, il a été démontré que la néoangiogenèse post-traumatique est un phénomène dynamique avec un pic à une semaine (Dray et al., 2009). Ainsi, la réorganisation post-lésionnelle du réseau vasculaire et la libération de facteurs trophiques dans la cavité lésionnelle notamment par les astrocytes réactifs activés par la lésion créeraient un environnement plus favorable à l'implantation des neurones embryonnaires. L'identification des facteurs sécrétés après la lésion par aspiration du cortex moteur serait intéressante pour ensuite vérifier si la modulation de l'environnement du transplant, par la surexpression ou l'administration de ces facteurs trophiques parallèlement à la transplantation, pourrait accroître l'efficacité des greffes. Par exemple, après lésion ischémique, les cellules souches neurales humaines transplantées dans le striatum survivent mieux lorsqu'elles surexpriment des

facteurs trophiques tels que le GDNF, le VEGF ou le BDNF et permettent une meilleure récupération des fonctions motrices (Lee et al., 2007 ; Lee et al., 2009 ; Lee et al., 2010). De même, dans un modèle animal de la maladie de Parkinson, la co-transplantation de neurones dopaminergiques embryonnaires et de cellules permettant l'administration de facteurs trophiques tels que le GDNF permet d'améliorer la survie des cellules transplantées, leur croissance axonale, et dans certains cas la récupération des fonctions motrices (Rodriguez-Pallares J, 2012 ; Wilby et al., 1999).

Dans l'optique d'une application thérapeutique de la transplantation neuronale, il paraît difficile dans le cas d'un certain nombre de lésions traumatiques du système nerveux central de réaliser la greffe de neurones immédiatement après la lésion ; aussi, la question de la fenêtre de temps pendant laquelle la transplantation neuronale est bénéfique est essentielle. Des résultats préliminaires réalisés au laboratoire à des délais post-lésionnels de 7 jours, plus courts (5 jours) ou plus longs (1 mois) nous ont permis de montrer que le délai de 7 jours était celui qui permettait d'accroître le plus la prolifération des cellules transplantées et le nombre de projections qu'elles développent vers les cibles du cortex moteur. Il est probable que des délais trop courts ne laisseraient pas le temps aux modifications post-lésionnelles décrites précédemment de s'établir ; et des délais trop longs pourraient ne pas être bénéfiques non plus, notamment du fait de l'apparition d'une cicatrice gliale et fibrotique qui représenterait une barrière physique et moléculaire à la repousse axonale (Silver et Miller., 2004).

Nous avons par la suite voulu vérifier si l'augmentation massive du nombre de projections développées par les cellules transplantées observée après transplantation avec délai, permettait aussi une meilleure récupération fonctionnelle. En effet, la transplantation expérimentale de neurones dopaminergiques embryonnaires chez les patients atteints de la maladie de Parkinson a montré que de faibles niveaux de croissance axonale des neurones transplantés étaient associés à de faibles niveaux de récupération fonctionnelle (Björklund et Lindvall, 2004). Par ailleurs, il a été démontré, dans un modèle murin de la maladie de Parkinson, que la reconstruction de la voie nigrostriée par les

neurones dopaminergiques embryonnaires transplantés permet une amélioration fonctionnelle (Gaillard et al., 2009 ; Thompson et al., 2009).

Il est difficile d'évaluer spécifiquement l'effet de la reconstruction anatomique des voies lésées, que nous avons démontrée, sur la récupération fonctionnelle puisqu'il a été démontré que la transplantation neuronale après lésion pouvait être bénéfique indépendamment de la reconstruction des voies lésées par les cellules transplantées. Ainsi, un « effet chaperon » des neurones transplantés sur les neurones de l'hôte a été décrit suite à la transplantation de cellules souches neurales dans un modèle de lésion des neurones dopaminergiques de la substance noire : les neurones transplantés permettent l'apport de facteurs trophiques ou neuroprotecteurs qui protègent et stimulent les neurones de l'hôte (Ourednik et al., 2002). De même, l'amélioration fonctionnelle décrite dès les premiers jours post-transplantation dans des tests de mémoire et d'apprentissage après transplantation de neurones embryonnaires dans des modèles de lésion du cortex frontal médian serait due à la protection du tissu environnant stabilisant la lésion et à un effet trophique des greffes sur les neurones de l'hôte, plutôt qu'au remplacement des voies lésées (Dunnett et al., 1987 ; Labbé et al., 1983). A plus long terme, les résultats démontrant le rétablissement anatomique des circuits lésés par les neurones transplantés (Gaillard et al., 2007) valident l'existence d'un substrat anatomique à la récupération fonctionnelle (Plumet et al., 1993 ; Riobos et al., 2001). Cependant, dans notre modèle, la corrélation entre les niveaux de repousse axonale et de récupération fonctionnelle n'a pas encore été démontrée. Même si l'introduction d'un délai entre la lésion et la transplantation peut aussi favoriser d'autres mécanismes permettant la récupération fonctionnelle, l'accroissement massif du nombre de projections développées par le transplant nous offre un bon modèle pour étudier cette corrélation.

Afin d'étudier la récupération fonctionnelle après transplantation, nous avons réalisé une étude comportementale par un test de préhension de nourriture sur 4 groupes d'animaux : contrôle (n'ayant subi aucune opération), lésé (ayant subi une lésion unilatérale par aspiration du cortex moteur), transplanté sans délai (ayant reçu un fragment de tissu embryonnaire immédiatement après la lésion), et transplanté avec délai (ayant reçu un fragment de tissu embryonnaire une semaine

après la lésion). Nos résultats montrent que les animaux greffés tendent à mieux récupérer que les animaux lésés, et cette tendance est plus marquée chez les animaux transplantés une semaine après la lésion, mais cette amélioration n'est pas significative. Différents paramètres peuvent expliquer ces résultats. D'une part, les résultats du groupe lésé montrent un certain niveau de récupération spontanée, semblant indiquer des phénomènes de plasticité et de compensation. Ces résultats sont en adéquation avec ceux précédemment décris où l'utilisation du même test de préhension avait permis de mettre en évidence des déficits moteurs de la patte controlatérale à la lésion induits par ce type de lésion mais où les auteurs avaient souligné que ces déficits étaient modestes (Baird et al., 2001). D'autre part, nous avons laissé les animaux libres d'utiliser leurs deux pattes antérieures. Or, il a été montré, par des tests de préhension dans ce même modèle de lésion et transplantation, que la récupération fonctionnelle induite par la greffe n'apparaît que si l'animal est forcé à utiliser la patte affectée par la lésion corticale (Plumet et al., 1993 ; Riolobos et al., 2001) et dans un modèle de lésion et transplantation striatale que cette récupération était usage-dépendante puisqu'elle nécessitait un entraînement intensif avec la patte affectée par la lésion (Döbrössy et Dunnett, 2006). Aussi, avant de conclure quand à l'effet de l'augmentation du nombre de projections développées par les cellules transplantées, consécutive à l'introduction d'un délai entre la lésion et la transplantation, sur la récupération fonctionnelle induite par les transplants, nous envisageons de répéter cette expérience en augmentant le nombre d'animaux, et en réadaptant nos conditions expérimentales.

Il serait intéressant d'étudier dans notre modèle d'étude la fonctionnalité des neurones transplantés par électrophysiologie *in vivo*. Par exemple, l'enregistrement de l'activité unitaire spontanée des neurones transplantés, et la modulation électrique ou pharmacologique de leur activité permettrait d'étudier leur intégration fonctionnelle aux réseaux de l'hôte *in vivo*. Par ailleurs, des expériences de microstimulation électrique des neurones transplantés permettraient d'étudier l'organisation topographique fonctionnelle du transplant et de vérifier si elle correspond à celle décrite dans le cortex sain (Neafsey et al., 1986).

Il semble improbable que la transplantation de neurones embryonnaires puisse un jour être utilisée en routine comme thérapie de remplacement cellulaire chez l'humain. En effet, elle serait confrontée d'une part à des problèmes éthiques et de disponibilité du matériel biologique puisque les cellules utilisées proviendraient d'embryons abortifs ; d'autre part, les essais cliniques réalisés dans le cadre du traitement expérimental de la maladie de Parkinson montrent que le manque d'uniformité des protocoles de préparation des cellules pour la transplantation induit une grande variabilité des bénéfices thérapeutiques obtenus (pour revue, Lindvall et Blörlund, 2004 ; Gaillard et Jaber, 2011). Aussi, un intérêt grandissant est désormais porté à la génération de populations neuronales spécifiques à partir de cellules souches comme source illimitée de cellules à transplanter.

Notre troisième étude s'inscrit dans cette lignée et a permis de démontrer qu'il est possible d'obtenir, à partir de cellules souches embryonnaires humaines ou de cellules souches pluripotentes induites, une population de neurones corticaux exhibant des propriétés adéquates à la fois *in vitro* et après transplantation *in vivo*. Les neurones corticaux ont été générés selon un procédé étonnement simple sans ajout de morphogènes. Dans ces conditions, il apparaît cependant *in vitro* que la proportion de neurones des couches superficielles est sous représentée. Il a été proposé que l'ajout d'un inhibiteur des histones déacétylases, l'acide valproïque (Juliandi et al., 2012), ou d'acide rétinoïque, impliqué *in vivo* dans l'acquisition de l'identité dorso-ventrale corticale (Shi et al., 2012), permettrait d'augmenter la proportion de neurones des couches superficielles. Par ailleurs, après transplantation, l'analyse à court terme des projections des neurones générés *in vitro* montre qu'ils semblent avoir majoritairement acquis une identité régionale de type « cortex visuel ». A plus long terme, leur identité régionale se diversifie, et des projections sont émises vers des cibles du cortex moteur et somatosensoriel. Il est probable que le niveau de maturation des cellules au moment de leur transplantation influe sur leur capacité à répondre à des signaux environnementaux présents dans le système nerveux immature et pouvant orienter leur identité régionale. En effet, conformément à ce qui avait été précédemment observé dans le cas de transplantation hétérotopiques de tissu embryonnaire cortical (Pinaudeau et

al., 2000), il a été démontré que la transplantation dans différents sites de cellules générées *in vitro* à partir de cellules souches et semblables à des progéniteurs corticaux au stade E12-E13 favorisait l'établissement de projections adaptées au site de transplantation (Ideguchi et al., 2010). Il serait intéressant de vérifier si ces phénomènes de re-spécification laminaire et régionale persisteraient dans un environnement mature par transplantation chez l'adulte. De plus, l'étude des projections développées par les cellules après des périodes de différenciation *in vitro* plus longues permettrait de vérifier si comme cela a été observé avec la transplantation de cellules embryonnaires prélevées à des stades plus tardifs de la corticogenèse, ils sont engagés irréversiblement dans une voie de différenciation. Enfin, mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui permettent la spécification régionale corticale permettrait de la moduler *in vitro* avant la transplantation. Par exemple, la modulation du signal Fgf8 permettrait d'influencer l'identité rostro-caudale des neurones générés *in vitro* (Eiraku et al., 2008).

Ainsi, la possibilité de différencier des cellules souches en neurones adaptés à différents modèles a été décrite à partir de cellules souches humaines ou murines, et les principales questions auxquelles devront répondre les prochaines études réalisées dans le domaine concernent (1) la validation de la spécificité des neurones générés à la fois *in vitro*, et *in vivo* après transplantation (2) l'évaluation de l'intégration fonctionnelle des cellules transplantées aux circuits de l'hôte adulte et leur implication sur la récupération des fonctions lésées (4) l'évaluation des risques liés à l'utilisation des neurones dérivés de cellules souches notamment du fait de leur potentiel tumorigène (5) la survie de cellules transplantées et le contrôle du rejet immunitaire du greffon.

La propension des cellules souches à générer des tumeurs semble être contrôlée lorsque les cellules sont implantées dans un environnement immature, chez le nouveau-né, et dépend également du stade de maturation des cellules transplantées (Ideguchi et al., 2010). Par ailleurs, la transdifférenciation, ou induction directe, de cellules somatiques en cellules neurales, sans passer par un état « souche » limiterait ce risque et offre donc de nouvelles perspectives (Nicholas and Kriegstein, 2010). La transdifférenciation a d'abord été décrite entre cellules de lignées proches, par exemple la reprogrammation de cellules pancréatiques

exocrines en cellules endocrines produisant de l'insuline, ces deux populations dérivant de l'endoderme (Zhou et al., 2008). Plus récemment, la reprogrammation directe *in vitro* de fibroblastes murins ou humains en neurones fonctionnels a été décrite (Pang et al., 2011 ; Vierbuchen et al., 2010). La reprogrammation directe d'astrocytes, lignée proche des cellules de la glie radiaire qui pendant le développement sont neurogéniques, en neurones fonctionnels matures de différents sous types a également été décrite, et représente un potentiel intéressant (Heinrich et al 2011 ; Heinrich et al., 2012). En effet, nous ne savons pas si la conversion des lignées, notamment éloignées, est complète, ou s'il reste une mémoire épigénétique du phénotype cellulaire d'origine (Vierbuchen et Wernig, 2011). Enfin, la reprogrammation directe *in vivo*, permettrait d'éviter la longue phase de culture *in vitro* (Vierbuchen et Wernig, 2011).

De plus, les neurones générés par transdifférenciation ou à partir de cellules souches pluripotentes induites, outre le fait qu'elles ne posent pas de problèmes éthiques, présentent l'avantage d'avoir le même fond génétique que le patient, écartant ainsi les risques de rejet immunitaire (Nicholas and Kriegstein, 2010).

La mobilisation des cellules souches endogènes de la SVZ est-elle envisageable comme stratégie de remplacement cellulaire chez l'humain ?

Les résultats de notre 4^e étude montrent que la lésion par aspiration du cortex moteur induit une augmentation transitoire de la prolifération cellulaire au niveau de la SVZ. Alors qu'en conditions physiologiques, les neuroblastes de la SVZ migrent en chaîne vers le bulbe olfactif via le flux rostral migratoire (RMS) (Lois et al., 1996), après lésion corticale, une partie des neuroblastes de la SVZ quitte le RMS et migre en direction du site de lésion où une partie d'entre eux se différencie en neurones matures. Cette migration est assistée par les vaisseaux sanguins et les astrocytes, et le couple SDF-1/CXCR4 participe à sa régulation.

Ainsi, les modifications prenant place après lésion corticale chez la souris laissent entrevoir l'espoir d'utiliser la mobilisation des cellules souches endogènes de la SVZ à des fins thérapeutiques. Cependant, un certain nombre de remarques peuvent être faites.

Tout d'abord, nous pouvons revenir sur un certain nombre de limites dues aux techniques disponibles pour tracer les cellules de la SVZ et évaluer leur prolifération. Afin d'étudier la prolifération cellulaire, nous avons utilisé la BrdU, un analogue de la thymidine, qui s'intercale dans l'ADN des cellules en division pendant la phase S du cycle cellulaire. Or, la synthèse d'ADN peut être initiée indépendamment de tout phénomène mitotique, par exemple dans des processus de réparation ou de mort cellulaire. De plus, la BrdU présente une certaine toxicité, et ne permet de marquer que les cellules en phase S parmi les cellules en prolifération au moment de l'injection (Taupin, 2007 ; Duque et Rakic, 2011). Ainsi, si l'utilisation de la BrdU a permis des avancées majeures dans l'étude de la neurogenèse, les résultats obtenus doivent être précautionneusement interprétés concomitamment à l'utilisation d'un protocole d'injection adapté au phénomène étudié. Par ailleurs, il peut être émis l'hypothèse que les neuroblastes BrdU positifs que nous avons observés dans le cortex péri-lésionnel peuvent être générés localement au niveau cortical suite à la lésion mais ne proviennent pas de la SVZ. En effet, il semble que des cellules souches quiescentes présentes dans des régions non-neurogéniques en conditions physiologiques puissent être activées en conditions pathologiques (pour revue, Lledo et al., 2006 ; Magavi et al., 2000). Aussi, l'injection stéréotaxique de rétrovirus ou lentivirus surexprimant la GFP dans la SVZ présente une solution alternative que nous avons exploitée pour s'assurer de l'origine des cellules. L'utilisation de virus infectant spécifiquement les cellules en prolifération aurait offert une meilleure spécificité. Cependant, cette technique est invasive, et ne permet de marquer que les cellules placées à proximité du site d'injection (Ming et Song, 2005). Finalement, le développement de souris transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle d'un promoteur cellule-spécifique, tel que la nestine ou DCX, représente une solution prometteuse. Cependant, de nombreux marqueurs spécifiques des cellules souches ou des neuroblastes immatures sont exprimés transitoirement, et la plupart des souris ainsi générées ne permettent pas d'étude à long terme. Décrit récemment, le modèle DCX-CreERT2, dans lequel l'expression durable de la GFP dans les cellules exprimant la DCX est induite par injection de tamoxifène, permettrait d'étudier la neurogenèse et la différenciation des neurones générés à long terme (Zhang et al., 2010).

Une autre problématique majeure concerne la survie, la différenciation, et la fonctionnalité des neuroblastes recrutés après la lésion. Nous avons observé qu'une partie seulement des neuroblastes générés dans la SVZ suite à la lésion et migrant vers le cortex lésé se différencient en neurones matures. De la même manière, il a été rapporté de faibles niveaux de survie ou de différenciation neuronale des cellules issues de la SVZ dans des modèles de lésions ischémiques modérées et restreintes au cortex (Gotts et Chesselet, 2005a) ou par MCAO (Arvidsson et al., 2002), de lésion striatale excitotoxique (Deierborg et al., 2009) et de lésions corticales traumatiques (Salman et al., 2004 ; Thau-Zuchman et al., 2012) ou par aspiration (Goings et al., 2004) ; aussi, la proportion de neurones lésés remplacés serait faible. Cependant, il a été démontré que les cellules souches de la SVZ limiteraient les déficits fonctionnels induits par la lésion. Ainsi, dans un modèle de lésion ischémique, la suppression conditionnelle des cellules DCX positives chez des souris transgéniques aggrave les déficits moteurs et sensorimoteurs associés à la lésion (Jin et al., 2010). A l'inverse, après lésion ischémique corticale, l'infusion de FGF2, facteur pro-mitotique, augmente le nombre de neuroblastes recrutés vers le site de lésion et réduit les déficits moteurs associés (Leker et al., 2007). De la même manière, l'administration de SDF1 et d'angiopoïétine favorise le recrutement des neuroblastes après lésion ischémique du cortex somatosensoriel, et permet la récupération des fonctions sensorimotrices affectées par la lésion (Ohab et al., 2006). Aussi, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulant la prolifération, la migration, et la différenciation post-traumatiques des neuroblastes de la SVZ après la lésion du cortex moteur, à laquelle nous avons contribué en soulignant le rôle du couple SDF-1/CXCR4, permettrait d'envisager l'administration des facteurs identifiés afin d'amplifier le phénomène de recrutement des précurseurs endogènes de la SVZ. De plus, il serait intéressant d'étudier le phénotype et l'intégration fonctionnelle aux circuits pré-existants des neurones recrutés, et d'évaluer leur capacité reconstruire les voies lésées en établissant des projections appropriées.

Enfin, toute la question du potentiel thérapeutique des cellules souches endogènes dans les processus de réparation cérébrale réside dans la transposition à l'humain des résultats obtenus chez l'animal.

Chez le rongeur, en conditions physiologiques, les cellules de la SVZ donnent continuellement naissance à de nombreux neurones bulbaires. Ces neurones participent aux performances olfactives, et à l'adaptation olfactive aux conditions environnementales changeant constamment (Breton-Provencher et Saghatelyan, 2012). La sur-représentation des fonctions olfactives chez le rongeur par rapport à l'humain pourrait expliquer les différences inter-espèces du système SVZ-RMS-BO, le système humain étant moins développé que celui des rongeurs. Si certaines études ont décrit une SVZ humaine semblable à celle des rongeurs, et la génération de neurones peuplant continuellement le bulbe olfactif humain via le RMS (Bedard et al., 2004 ; Bernier et al., 2000 ; Wang et al., 2011), la persistance en conditions physiologiques chez l'adulte de la neurogenèse post-développementale et la présence du RMS sont sujettes à controverse (Bergmann et al., 2012 ; pour revue, Macklis et al., 2012 ; Sanai et al., 2004 ; Sanai et al., 2007 ; Sanai et al., 2011).

De manière intéressante, il apparaît cependant que des modifications de la prolifération cellulaire dans la SVZ peuvent apparaître en conditions pathologiques chez l'humain. Ainsi, il a été rapporté une augmentation de la prolifération cellulaire dans la SVZ corrélée à la sévérité de la maladie chez des patients atteints de la maladie de Huntington (Curtis et al., 2003), ou après lésion ischémique (Macas et al., 2006). Par ailleurs, la présence de nouveaux neurones immatures dans le cortex péri-lésionnel de patients ayant subi une lésion ischémique a été rapportée, mais les auteurs n'ont pas étudié la prolifération cellulaire dans la SVZ de ces patients et l'origine de ces neuroblastes n'est donc pas définie (Jin et al., 2006).

Aussi, si l'on admet que la neurogenèse secondaire semble limitée en conditions physiologiques chez l'humain, nous ne pouvons pas exclure qu'elle puisse être réactivée en conditions pathologiques, et être exploitée à des fins thérapeutiques. Il faudrait cependant également étudier la capacité des neuroblastes de la SVZ humaine à migrer vers des sites de lésion éloignés tels que le cortex. En effet, chez le rongeur, il a été démontré après lésion ischémique corticale que les neuroblastes parcouraient jusqu'à 1mm vers le site de lésion corticale (Ohab et al., 2006) ; chez l'humain, la distance à parcourir pour atteindre le cortex serait plus importante. De plus, des différences inter-espèces entre les rongeurs et les primates semblent exister quand au comportement migratoire des neuroblastes de

la SVZ puisqu'une étude chez le primate non-humain a montré qu'après lésion ischémique, bien que la prolifération cellulaire dans la SVZ augmente, les neuroblastes ne quittent pas leur voie normale de migration vers le bulbe olfactif (Tonchev et al., 2005).

Enfin, le modèle de lésion du cortex moteur par aspiration que nous avons utilisé dans ce travail est un modèle simple et reproductible qui permet de répondre à des questions fondamentales concernant le développement cortical et les mécanismes de réparation cérébrale par transplantation neuronale ou la réponse endogène du système nerveux central en conditions lésionnelles, mais ne correspond à aucune pathologie humaine. En particulier, la lésion par aspiration est une lésion aigüe qui détruit immédiatement les corps cellulaires et les axones afférents et efférents. A l'inverse, de nombreuses pathologies entraînent des lésions progressives comme c'est le cas de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Huntington (pour revue, Raymon et al., 2011) et la maladie de Parkinson (pour revue, Barzilai et Melamed, 2003), ou après ischémie (Carmichael et Chesselet, 2002 ; Salin et Chesselet, 1992 ; Szele et al., 1995). Aussi, les résultats obtenus dans le modèle de lésion par aspiration devront être validés dans des modèles lésionnels plus proches des pathologies humaines. Ainsi, par exemple, après avoir démontré dans le modèle de lésion corticale par aspiration la possibilité de reconstruction anatomique des voies lésées par la transplantation de neurones corticaux embryonnaires (Gaillard et al., 2007), de telles capacités de repousse axonale ont été validées dans un modèle de la maladie de Parkinson (Gaillard et al., 2009 ; Thompson et al., 2009).

CONCLUSION

En conclusion, nos travaux présentent une originalité dans le domaine de la réparation cérébrale puisqu'ils se sont intéressé à la fois aux mécanismes de remplacement des neurones lésés par les cellules souches endogènes, et par l'apport exogène de cellules par la transplantation. Il a été démontré dans un modèle de lésion corticale ischémique chez le rat que la transplantation de cellules souches neurales embryonnaires humaines favorisait la prolifération des cellules souches de la SVZ (Zhang et al., 2011). Aussi, il serait intéressant d'étudier dans notre modèle si les cellules de la SVZ et les neurones transplantés pourraient agir en synergie pour remplacer les neurones lésés.

De plus, nous avons étudié des mécanismes fondamentaux liés à la réparation cérébrale par transplantation en tirant avantage d'un modèle bien décrit, la transplantation de neurones embryonnaires ; mais avons également exploré le potentiel de modèles prometteurs basés sur l'utilisation de neurones dérivés de cellules souches.

Enfin, notre approche nous a permis d'évaluer le potentiel réparateur des stratégies de remplacement cellulaire aussi bien à l'échelle cellulaire et moléculaire qu'à l'échelle fonctionnelle et comportementale.

De nombreuses questions sont encore en suspens avant l'application de ces stratégies réparatrices à l'humain, et les réponses que nous pourrons apporter dépendront pour beaucoup des outils techniques dont nous disposerons. Par exemple, l'optogénétique, qui permettrait l'activation ou l'inhibition des cellules transplantées, permettrait de disséquer les mécanismes liés à l'intégration fonctionnelle des cellules transplantées (Tønnesen et al., 2011).

BIBLIOGRAPHIE

1. Agasse F, Nicoleau C, Petit J, Jaber M, Roger M, Benzakour O, Coronas V (2007). Evidence for a major role of endogenous fibroblast growth factor-2 in apoptotic cortex-induced subventricular zone cell proliferation. *Eur J Neurosci* 26: 3036-3042.
2. Ahlenius H, Visan V, Kokaia M, Lindvall O, Kokaia Z (2009). Neural stem cell and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiate into functionnal neurons despite their lower number in aged brain. *J Neurosci* 29: 4408-4419.
3. Akintunde A, Buxton DF (1992). Origins and collateralization of corticospinal, corticopontine, corticorubral and corticostriatal tracts : a multiple retrograde fluorescent tracing study. *Brain Res* 586: 208-218.
4. Al Masri O (2011). An essay on the human corticospinal tract: history, development, anatomy and connections. *Neuroanatomy* 10:1-4.
5. Altman J, Das GD (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319-335.
6. Amankulor NM, Hambardzumyan D, Pyonteck SM, Becher PJ, Joyce JA, Holland EC (2009). Sonic hedgehog pathway activation is induced by acute brain injury and regulated by injury-related inflammation. *J Neurosci* 29: 10299-10308.
7. Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL (2001). Can stem cells cross lineage boundaries ? *Nat Med* 7: 393-395.
8. Andreu-Agulló C, Morante-Redolat JM, Delgado AC, Fariñas I (2009). Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependant stemness in the adult subependymal zone. *Nat Neurosci* 12: 1514-1523.
9. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8: 963-970.
10. Au E, Fishell G (2008). Cortex shatters the glass ceiling. *Cell stel cell* 3: 472-474.

11. Backlund EO, Granberg PO, Hamberger B, et al (1985). Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J Neurosurg* 62: 169-173.
12. Baer K, Eriksson PS, Faull RL, Rees MI, Curtis MA (2007). Sox-2 is expressed by glial and progenitor cells and Pax-6 is expressed by neuroblasts in the human subventricular zone. *Exp Neurol* 204: 828-831.
13. Baird AL, Meldrum A, Dunnett SB (2001). The staircase test of skilled reaching in mice. *Brain Res Bull* 54: 243-250.
14. Bally-Cuif L, Hammerschmidt M (2003). Induction and patterning of neuronal development, and its connection to cell cycle control. *Curr Opin Neurobiol* 13: 16-25.
15. Barth TM, Stanfield BB (1994). Homotopic, but not heterotopic, fetal cortical transplants can result in functional sparing following neonatal damage to the frontal cortex in rats. *Cereb Cortex* 4: 271-278.
16. Barzilai A, Melamed E (2003). Molecular mechanism of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *Trends Mol Med* 9: 126-132.
17. Bédard A, Parent A (2004). Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain Res Dev Brain Res* 151: 159-168.
18. Belichenko PV, Mattsson B, Johansson BB (2001). Neuronal and fibre organization in neocortical graft placed in post-ischaemic adult rat brain: a three-dimensional confocal microscopy study. *J Comp Pathol* 124: 142-148.
19. Bergmann O, Liebl J, Bernard S, Alkass K, Yeung MS, Steier P, Kutschera W, Jonhson L, Landén M, Druid H, Spalding KL, Frisén J (2012). The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron* 74: 634-639.
20. Bernier PJ, Vinet J, Cossette M, Parent A (2000). Characterization of the subventricular zone of the adult human brain: evidence for the involvement of Bcl-2. *Neurosci Res* 37: 67-78.
21. Bibel M, Richter J, Schrenk K, Tucker KL, Staiger V, Korte M, Goetz M, Barde YA (2004). Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat Neurosci* 7: 1003-1009.

22. Björklund A, Dunnett SB (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30: 194-202.
23. Bolteus Aj, Bordey A (2004). GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 24: 7623-7631.
24. Bovetti S, Hsieh YC, Bovolin P, Perrotteau I, Kazunori T, Puche AC (2007). Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 27: 5976-5980.
25. Bragin A, Takács J, Vinogradova O, Hámori J (1991). Quantitative estimation of the ratio of GABA-immunoreactive cells in neocortical grafts. *J Neural Transplant Plast* 2: 235-242.
26. Bragin A, Takács J, Vinogradova O, Gogelia K, Hámori J (1993). Age-related loss of GABA-positive and GABA-negative neurons in neocortical transplants. *J Neural Transplant Plast* 4: 53-59.
27. Breton-Provencher V, Saghatelian A (2012). Newborn neurons in the adult olfactory bulb: unique properties for specific odor behaviour. *Behav Brain Res* 227: 480-489.
28. Brezun JM, Dzsuta A (1999). Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* 89: 999-1002.
29. Brodmann K (1905). Beitrage zur histologische lokalization der Grosshirinde: Dritte Mitteilung. Die Eindenfeldern der niederen Affen. *J Psychol. Neurol.* 4: 177-226.
30. Brooks SP, Dunnett SB (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci* 10: 519-529.
31. Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467: 1-10.
32. Briggs F, Ursey WM (2008). Emergins views of thalamic function. *Curr Opin Neurobiol* 18: 403-407.
33. Brown LL, Smith DM, Goldbloom LM (1998). Organizing principles of cortical integration in the rat neostriatum: corticostriate map of the body surface is

- an ordered lattice of curved laminae and radial points. *J Comp Neurol* 392: 468-488.
34. Buffo A, Vosko MR, Ertürk D, Hamann GF, Jucker M, Rowitch D, Götz M (2005). Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injury: implications for neuronal repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18183-18188.
 35. Buffo A, Rolando C, Ceruti S (2010). Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol* 79: 77-89.
 36. Bukhoeveden DP, Casanova MF (2002). The minicolumn hypothesis in neuroscience. *Brain* 125: 935-951.
 37. Bystron I, Rakic P, Molnár Z, Blakemore C (2006). The first neurons of the human cerebral cortex. *Nat Neurosci* 9: 88-96.
 38. Bystron I, Blakemore C, Rakic P (2008). Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci* 9: 110-122.
 39. Cameron HA, McKay RD (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435: 496-417.
 40. Carlén M, Meletis K, Göritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, Amendola M, Barnabé-Heider F, Yeung MS, Naldini L, Honjo T, Kokaia Z, Shupliakov O, Cassidy RM, Lindvall O, Frisén J (2009). Forebrain ependymal cells are Notch dependant and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci* 12: 259-267.
 41. Carmichael ST, Chesselet MF (2002). Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult. *J Neurosci* 15: 6062-6070.
 42. Casper D, Engstrom SJ, Mirchandani GR, Pidel A, Palencia D, Cho PH, Brownlee M, Edelstein D, Federoff HJ, Sonstein WJ (2002). Enhanced vascularization and survival of neural transplants with ex vivo angiogenic gene transfer. *Cell Transplant* 11: 331-349.
 43. Castro AJ, Zimmer J, Sunde NA, Bold EL (1985). Transplantation of fetal cortex to the brain of newborn rats: a retrograde fluorescent analysis of callosal and thalamic projections from the transplant to host. *Neurosci Lett* 60: 283-288.

44. Chang FF, Steedman JG, Lund RG (1984). Embryonic cerebral cortex placed in the occipital region of newborn rats make connections with the host brain. *Dev Brain Res* 13: 164-166.
45. Chang FL, Steedman JG, Lund RD (1986). The lamination and connectivity of embryonic cerebral cortex transplanted into newborn rat cortex. *J Comp Neurol* 244: 401-411.
46. Chen Xh, Iwata A, Nonaka M, Browne KD, Smith DH (2003). Neurogenesis and glial proliferation persist for at least one year in the subventricular zone following brain trauma in rats. *J Neurotrauma* 20: 623-631.
47. Cheng Q, Di Liberto V, Caniglia G, Mudò G (2008). Time-course of GDNF and its receptor expression after brain injury in the rat. *Neurosci Lett* 439: 24-29.
48. Chirumamilla S, Sun D, Bullock MR, Colello RJ (2002) Traumatic brain injury induced cell proliferation in the adult mammalian central nervous system. *J Neurotrauma* 19: 693-703.
49. Chuang CS, Su HL, Cheng FC, Hsu SH, Chuang CF, Liu CS (2010). Quantitative evaluation of motor function before and after engraftment of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Biomed Sci* 13: 17-19.
50. Circata F, Serapide MF, Nicotra G, Raffaele R (1992). Homotopic transplant of fetal cortex to lesioned motor cortex of adult rats. A comportemental and anatomical study. *Arch Ital Biol* 130: 101-111.
51. Clowry G, Molnár Z, Rakic P (2010). Renewed focus on the developing human neocortex. *J Anat* 217: 276-288.
52. Collier TJ, Sortwell CE, Daley BF (1999). Diminished viability, growth, and behavioural efficacy of fetal dopamine neurons grafts in aging rats with long-term dopamine depletion: an argument for neurotrophic supplementation. *J Neurosci* 19: 5563-5573.
53. Conover JC, Doetsch F, García-Verdugo JM, Gale NW, Yancopoulos GD, Alvarez-Buylla A (2000). Disruption of Eph/ephrin signalling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci* 3: 1091-1097.
54. Cordeiro K, Jiang W, Papazoglou A, Tenório SB, Döbrössy M, Nikkhah G (2010). Graft-mediated functional recovery on a skilled forelimb use

- paradigm in a rodent model of Parkinson's disease is dependent on reward contingency. *Behav Brain Res* 212: 187-195.
55. Coronas V, Bantubungi K, Fombonne J, Krantic S, Schiffmann SN, Roger M (2004). Dopamine D3 receptor stimulation promotes the proliferation of cells derived from the post-natal subventricular zone. *J Neurochem* 91: 1292-1301.
56. Costa MR, Kessaris N, Richardson WD, Götz M, Hedin-Pereira C (2007). The marginal zone/layer I as a novel niche for neurogenesis and gliogenesis in developing cerebral cortex. *J Neurosci* 27: 11376-11388.
57. Courtès S, Vernerey J, Pujadas L, Magalon K, Cremer H, Soriano E, Durbec P, Cayre M (2011). Reelin controls progenitor cell migration in the healthy and pathological adult mouse brain. *PLoS One* 6: e20430.
58. Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kraemer P, Scheffer S, et al. (1994). Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367: 455-459.
59. Creutzfeld OD (1977). Generality of the functional structure of the neocortex. *Naturwissenschaften* 64: 507-517.
60. Curtis MA, Penney EB, Pearson AG, van Roon-Mom WM, Butterworth NJ, Dragunow M, Connor B, Faull RL (2003). Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proc Natl Acad U S A* 100: 9023-9027.
61. Curtis MA, Waldvogel HJ, Synek B, Faull RL (2005). A histochemical and immunohistochemical analysis of the subependymal layer in the normal and Huntington's disease brain. *J Chem Neuroanat* 30: 55-66.
62. Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelso C, Holtås S, van Roon-Mom WM, Björk-Eriksson T, Nordborg C, Frisén J, Dragunow M, Faull RL, Eriksson PS (2007). Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315: 1243-1249.
63. Darling WG, Pizzimenti MA, Morecraft RJ (2011). Functional recovery following motor cortex lesions in non-human primates: experimental implications for human stroke patients. *J Integr Neurosci* 10: 353-384.

64. Das GD, Altman J (1971). Transplanted precursors of nerve cells: their fate in the cerebellums of young rats. *Science* 173: 637-638.
65. Das GD, Hallas BH, Das KG (1980). Transplantation of brain tissue in the brain of rat. I. Growth characteristics of neocortical transplants from embryos of different ages. *Am J Anat* 158: 135-145.
66. Decimo I, Bifary F, Krampera M, Fumagalli G (2012). Neural stem cell niches in health and disease. *Curr Pharm Des* 18: 1755-1783.
67. Deierborg T, Staflin K, Pesic J, Roybon L, Brundin P, Lundberg C (2009). Absence of striatal newborn neurons with mature phenotypes following defined striatal and cortical excitotoxic brain injuries. *Exp Neurol* 219: 363-367.
68. Del Conte G (1907). Einpflanzungen von embryonalen Gewebe ins Gehirn. *Beitr Pathol Anat* 42: 193-202.
69. Deschênes M, Veinante P, Zhang ZW (1998). The organization of corticothalamic projections: reciprocity versus parity. *Brain Res Rev* 28: 286-308.
70. Diamond IT, Jones EG, Powell TP (1969). The projection of the auditory cortex upon the diencephalon and brain stem in the cat. *Brain Res* 15: 305-340.
71. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321: 1218-1221.
72. Döbrössy MD, Dunnett SB (2006). The effects of lateralized training on spontaneous forelimb preference, lesion deficits, and graft-mediated functional recovery after unilateral striatal lesions in rats. *Exp Neurol* 199: 373-383.
73. Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997). Cellular composition and three-dimensionnal organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17: 5046-5061.
74. Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97: 703-716.

75. D'Onofrio PM, Thayaparajah M, Lysko MD, Magharios M, Spratt SK, Lee G, Ando D, Surosky R, Fehlings MG, Koeberle PD (2011). Gene therapy for traumatic central nervous system injury and stroke using an engineered zinc finger protein that upregulates VEGF-A. *J Neurotrauma* 28: 1863-1879.
76. Dray C, Rougon G, Debarbieux F (2009). Quantitative analysis by in vivo imaging of the dynamics of vascular and axonal networks in injured mouse spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 9459-9464.
77. Dunn EH (1917). Primary and secondary findings in a series of attempts to transplant cerebral cortex in the albino rat. *J Comp Neurol* 27: 565-582.
78. Dunnett SB, Ryan CN, Levin PD, Reynolds M, Bunch ST (1987). Functional consequences of embryonic neocortex transplanted to rats with prefrontal cortex lesions. *Behav Neurosci* 101: 489-503.
79. Dunnett SB (2010). Chapter 55: neural transplantation. *Handbook of Clinical Neurology* 95: 885-912.
80. Duque A, Rakic P (2011). Different effects of bromodeoxyuridine and [³H]thymidine incorporation into DNA on cell proliferation, position, and fate. *J Neurosci* 31: 15205-15217.
81. Dusart I, Nothias F, Roudier F, Besson JM, Peschanski M (1989). Vascularization of fetal cell suspension grafts in the excitotoxically lesioned adult rat thalamus. *Brain Res Dev Brain Res* 48: 215-228.
82. Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457: 277-280.
83. Ebrahimi A, Pochet R, Roger M (1992). Topographical organization of the projections from physiologically identified areas of the motor cortex to the striatum in the rat. *Neurosci Res* 14: 39-60.
84. Ebrahimi-Gaillard A, Guitet J, Garnier C, Roger M (1994). Topographic distribution of efferent fibers originating from homotopic or heterotopic transplants: heterotopically transplanted neurons retain some of the developmental characteristics corresponding to their site of origin. *Brain Res Dev Brain Res* 77: 271-283.

85. Ebrahimi-Gaillard A, Beck T, Gaillard F, Wree A, Roger M (1995). Transplants of embryonic cortical tissue placed in the previously damaged frontal cortex of adult rats: local cerebral glucose utilization following execution of forelimb movements. *Neuroscience* 64: 49-60.
86. Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M, Wataya T, Nishiyama A, Muguruma K, Sasai Y (2008). Self-organised formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* 3: 519-532.
87. Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O (2009). Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience* 158: 1021-1029.
88. Encarnacion A, Horie N, Keren-Gill H, Bliss TM, Steinbeg GK, Shamloo M (2011). Long-term behavioural assessment of function in an experimental model for ischemic stroke. *J Neurosci Methods* 196: 247-254.
89. Eriksdotter-Nilsson M, Olson L (1989). Growth of brain tissue grafts is dependant upon host age. *Mech Ageing Dev* 49: 1-22.
90. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4: 1313-1317.
91. Finger S, Dunnett SB (1989). Nimodipine enhances growth and vascularization of neural grafts. *Exp Neurol* 104: 1-9.
92. Floeter MK, Jones EJ (1984). Connections made by transplants to the cerebral cortex of rat brains damaged in utero. *J Neurosci* 4: 141-150.
93. Francis KR, Wei L (2010). Human embryonic stem cell neural differentiation and enhanced cell survival promoted by hypoxic preconditioning. *Cell Death Dis* 2010; 1e22.
94. Frappé I, Roger M, Gaillard A (1999). Transplants of fetal frontal cortex grafted into the occipital cortex of newborn rats receive a substantial thalamic input from nuclei normally projecting to the frontal cortex. *Neuroscience* 89: 409-421.
95. Fricker RA, Annett LE, Torres EM, Dunnett SB (1996). The placement of a striatal ibotenic acid lesion affects skilled forelimb use and the direction of drug-induced rotation. *Brain Res Bull* 41: 409-416.

96. Fricker RA, Torres EM, Hume SP, Myers R, Opacka-Juffrey J, Ashworth S, Brooks DJ, Dunnett SB (1997). The effects of donor stage on the survival and function of embryonic striatal grafts in the adult rat brain. II. Correlation between positron emission tomography and reaching behaviour. *Neuroscience* 79: 711-721.
97. Gage FH (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287: 1433-1438.
98. Gaillard A, Gaillard F, Roger M (1998). Neocortical grafting to newborn and adult rats: developmental, anatomical and functional aspects. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 148: 1-86.
99. Gaillard A, Roger M (2000). Early commitment of embryonic neocortical cells to develop area-specific thalamic connections. *Cereb Cortex* 10: 443-453.
100. Gaillard A, Nasarre C, Roger M (2003). Early (E12) cortical progenitors can change their fate upon heterotopic transplantation. *Eur J Neurosci* 17: 1375-1383.
101. Gaillard A, Prestoz L, Dumartin B, Cantereau A, Morel F, Roger M, Jaber M (2007). Reestablishment of damaged adult motor pathways by grafted embryonic cortical neurons. *Nat Neurosci* 10: 1294-1299.
102. Gaillard A, Jaber M (2007). Is the outgrowth of transplant-derived axons guided by host astrocytes and myelin loss ? *Cell Adh Migr* 1: 161-164.
103. Gaillard A, Jaber M (2011). Rewiring the brain with cell transplantation in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 34: 124-133.
104. Gaillard A, Decressac M, Frappé I, Fernagut PO, Prestoz L, Besnard S, Jaber M (2009). Anatomical and functional reconstruction of the nigrostriatal pathway by intranigral transplants. *Neurobiol Dis* 35: 477-488.
105. Gaillard F, Domballe L, Gaillard A (2004). Fetal cortical allografts project massively through the adult cortex. *Neuroscience* 126: 631-637.
106. García-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Alvarez-Buylla A (1998). Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol* 36: 234-248.
107. Garnier C, Arnault P, Ebrahimi-Gaillard A, Létang J, Roger M (1995). The topographic distribution of the efferents from neocortical neurons is not only dependant upon where in the neocortex the cells develop. A

- transplantation study with one single neocortical region. *Brain Res Dev Brain Res* 89: 1-10.
108. Gaspard N, Bouschet T, Hourez R, Dimidschstein J, Naeije G, van den Ameele J, Espuny-Camacho I, Herpoel A, Passante L, Schiffmann SN, Gaillard A, Vanderhaeghen P (2008). An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature* 455: 351-357.
109. Gaspard N, Bouschet T, Herpoel A, Naeije G, van den Ameele J, Vanderhaeghen P (2009a). Generation of cortical neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc* 4: 1454-1463.
110. Gaspard N, Gaillard A, Vanderhaeghen P (2009b). Making cortex in a dish: *in vitro* corticogenesis from embryonic stem cells. *Cell cycle* 8: 2491-2496.
111. Gaspard N, Vanderhaeghen P (2010). Mechanisms of neural specification from embryonic stem cells. *Curr Opin Neurobiol* 20: 37-43.
112. Genander M, Frisén J (2010). Ephrins and Eph receptors in stem cells and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 22: 611-616.
113. Gibbs RB, Cotman CW (1987). Factors affecting survival and outgrowth from transplants of entorhinal cortex. *Neuroscience* 21: 699-706.
114. Givogry MI, de Planell M, Galbiati F, Superchi D, Gritti A, Vescovi A, de Vellis J, Bongarzone ER (2006). Notch signaling in astrocytes and neuroblasts of the adult subventricular zone in health and after cortical injury. *Dev Neurosci* 28: 81-91.
115. Goings GE, Wibisono BL, Szele FG (2002). Cerebral cortex lesions decrease the number of bromodeoxyuridine-positive subventricular zone cells in mice. *Neurosci Lett* 329: 161-164.
116. Goldman SA, Nottebohm F (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 2390-2394.
117. Gonzalez MF, Sharp FR (1987). Fetal frontal cortex transplanted to injured motor/sensory cortex of adult rats. I. NADPH-Diaphorase neurons. *J Neurosci* 7: 2991-3001.

118. Gottlieb DI (2002). Large-scale sources of neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 25: 381-407.
119. Gotts JE, Chesselet MF (2005a). Migration and fate of newly born cells after focal ischemia in adult rats. *J Neurosci Res* 80: 160-171.
120. Gotts JE, Chesselet MF (2005b). Vascular changes in the subventricular zone after distal cortical lesions. *Exp Neurol* 194: 139-150.
121. Götz M, Huttner WB (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature Rev Mol* 6: 777-778.
122. Gould E, Cameron HA (1996). Regulation of neuronal birth, migration and death in the rat dentate gyrus. *Dev Neurosci* 18: 22-35.
123. Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG (1999). Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286: 548-552.
124. Gould E (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals ? *Nat Rev Neurosci* 8: 481-488.
125. Grabowski M, Christofferson RH, Brundin P, Johansson BB (1992). Vascularization of fetal neocortical grafts implanted in brain infarcts in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* 51: 673-682.
126. Grabowski M, Brundin P, Johansson BB (1993a). Functional integration of cortical grafts placed in brain infarcts of rats. *Ann Neurol* 34: 362-368.
127. Grabowski M, Brundin P, Johansson BB (1993b). Paw-reaching, sensorimotor, and rotational behavior after brain infarction in rats. *Stroke* 24: 889-895.
128. Grabowski M, Jahansson BB, Brundin P (1994). Survival of fetal neocortical grafts implanted in brain infarcts of adult rats: the influence of postlesion time and age of donor tissue. *Exp Neurol* 127: 126-136.
129. Grabowski M, Johansson BB, Brundin P (1995). Neocortical grafts placed in the infarcted brain of adult rats: few or no efferent fibers grow from transplant to host. *Exp Neurol* 134: 273-276.
130. Guitet J, Garnier C, Ebrahimi-Gaillard A, Roger M (1994). Efferents of frontal or occipital cortex grafted into adult rat's motor cortex. *Neurosci Lett* 180: 265-268.

131. Hack I, Bancila M, Loulier K, Carroll P, Cremer H (2002). Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat Neurosci* 5: 939-945.
132. Hagino S, Iseki K, Mori T, Zhang Y, Hikake T, Yokoya S, Takeuchii M, Hasimoto H, Kikuchi S, Wanaka A (2003). Slit and glypcan mRNAs are coexpressed in the reactive astrocytes of the injured adult brain. *Glia* 42: 130-138.
133. Hallas BH, Das GD, Das KG (1980). Transplantation of brain tissue in the brain of rats. II. Growth characteristics of neocortical transplants in hosts of different ages. *Am J Anat* 158: 147-159.
134. Hargus G, Cooper O, Deleidi M, Levy A, Lee K, Marlow E, Yow A, Soldner F, Hochemeyer D, Hallett PJ, Osborn T, Jaenisch R, Isacson O (2009). Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15921-15926.
135. Hatanaka Y, Murakami F (2002). In vitro analysis of the origin, migratory behavior, and maturation of cortical pyramidal cells. *J Comp Neurol* 454: 1-14.
136. Heinrich C, Gascón S, Masserdotti G, Lepier A, Sanchez R, Simon-Ebert T, Schroeder T, Götz M, Berninger B (2011). Generation of subtype-specific neurons from postnatal astroglia of the mouse cerebral cortex. *Nat Protoc* 6: 214-228.
137. Heinrich C, Götz M, Berninger B (2012). Reprogramming of postnatal astroglia of the mouse neocortex into functional, synapse-forming neurons. *Methods Mol Biol* 814: 485-498.
138. Hendry SH, Schwark HD, Jones EG, Yan J (1987). Numbers and proportion of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. *J Neurosci* 7: 1503-1519.
139. Hitoshi S, Seaberg RM, Koscik C, Alexson T, Kusunoki S, Kanazawa I, Tsuji S, van der Kooy D (2004). Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes Dev* 18: 1806-1811.

140. Hitoshi S, Maruta N, Higashi M, Kumar A, Kato N, Ikenaka K (2007). Antidepressant drugs reverse the loss of adult neural stem cells following chronic stress. *J Neurosci Res* 85: 3574-3585.
141. Höglinder GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7: 726-735.
142. Hoffer ZS, Alloway KD (2001). Organization of corticostriatal projections from the vibrissal representations in the primary motor and somatosensory cortical areas of rodents. *J Comp Neurol* 439: 87-103.
143. Hotta N, Aoyama M, Inagaki M, Ishihara M, Miura Y, Tada T, Asai K (2005). Expression of glia maturation factor beta after cryogenic brain injury. *Brain Res Mol Brain Res* 133: 71-77.
144. Houdé O, Mazoyer B, Tzourio-Mazoyer N (2002). *Cerveau et psychologie. Introduction à l'imagerie cérébrale anatomique et fonctionnelle.* Paris : Presses Universitaires de France.
145. Hu H (2000). Polysialic acid regulates chain formation by migrating olfactory interneuron precursors. *J Neurosci Res* 61: 480-492.
146. Hu BY, Zhang SC (2009). Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat Protoc* 4: 1295-1304.
147. Ideguchi M, Palmer TD, Recht LD, Weimann JM (2010). Murine embryonic stem cell-derived pyramidal neurons integrate into the cerebral cortex and appropriately project axons to subcortical targets. *J Neurosci* 30: 894-904.
148. Ihrie RA, Alvarez-Buylla A (2011). Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron* 70: 674-686.
149. Jackson EL, Alvarez-Buylla A (2008). Characterization of adult neural stem cells and their relation to brain tumors. *Cells Tissues Organs* 188: 212-224.
150. Jacques TS, Relvas JB, Nishimura S, Pytela R, Edwards GM, Streuli CH, ffrench-Constant C (1998). Neural precursor cell chain migration and division

- are regulated through different beta1 integrins. *Development* 125: 3167-3177.
151. Jaeger CB, Lund RD (1980). Transplantation of embryonic occipital cortex to the tectal region of newborn rats: a light microscopy study of organization of the transplants. *J Comp Neurol* 194: 571-597.
152. Jin J, Kang HM, Park C (2010). Voluntary exercise enhances survival and migration of neural progenitor cells after intracerebral haemorrhage in mice. *Brain Inj* 24: 533-540.
153. Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y, Shen J, Mao Y, Banwait S, Greenberg DA (2006). Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13198-13202.
154. Jin K, Mao X, Xie L, Greenberg RB, Peng B, Moore A, Greenberg MB, Greenberg DA (2010). Delayed transplantation of human neural precursor cells improves outcome from focal cerebral ischemia in aged rats. *Aging Cell* 9: 1076-1083.
155. Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Greenberg DA (2010). Transgenic ablation of doublecortin-expressing cells suppresses adult neurogenesis and worsens stroke outcome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 7993-7998.
156. Juliandi B, Abematsu M, Sanosaka T, Tsujimura K, Smith A, Nakashima K (2012). Induction of superficial cortical layer neurons from mouse embryonic stem cells by valproic acid. *Neurosci Res* 72: 23-31.
157. Kam M, Curtis MA, McGlachan SR, Connor B, Nannmark U, Faull RL (2009). The cellular composition and morphological organization of the rostral migratory stream in the adult human brain. *J Chem Neuroanat* 37: 196-205.
158. Kaplan MS, McNelly NA, Hinds JW (1985). Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*: 239 :117-125.
159. Koizumi H, Higginbotham H, Poon T, Tanaka T, Brinkman BC, Gleeson JG (2006). Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nat Neurosci* 9: 779-786.

160. Komitova M, Zhao LR, Gidö G, Johansson BB, Eriksson P (2005). Postischemic exercise attenuates whereas enriched environment has certain enhancing effects on lesion-induced subventricular zone activation in the adult rat. *Eur J Neurosci* 21: 2397-2405.
161. Koopmans GC, Deumens R, Honig WM, Hamers FP, Steinbusch HW, Joosten EA (2005). The assessment of locomotor function in spinal cord injured rats: the importance of objective analysis of coordination. *J Neurotrauma* 22: 214-225.
162. Kreuzberg M, Kanov E, Timofeev O, Schwaninger M, Monyer H, Khodosevich K (2010). Increased subventricular zone-derived cortical neurogenesis after ischemic lesion. *Exp Neurol* 226: 90-99.
163. Kriegstein AR, Noctor SC (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci* 27: 392-399.
164. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32: 149-184.
165. Krum JM, Rosenstein JM (1988). Patterns of angiogenesis in neural transplant model: II. Fetal neocortical transplants. *J Comp Neurol* 271: 331-345.
166. Krum JM, Rosenstein JM (1989). The fine structure of vascular-astroglial relations in transplanted fetal neocortex. *Exp Neurol* 103: 203-212.
167. Kunke D, Bryja V, Mygland L, Arenas E, Krauss S (2009). Inhibition of canonical Wnt signaling promotes gliogenesis in PO-NSCs. *Biochem Biophys Res Commun* 386: 628-633.
168. Labbe R, Firl A Jr, Mufson EJ, Stein DG (1983). Fetal brain transplant: reduction of cognitive deficits in rats with frontal cortex lesions. *Science* 221: 470-472.
169. Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19: 7881-7888.
170. Lee HJ, Kim KS, Park IH, Kim SU (2007). Human neural stem cells over-expressing VEGF provide neuroprotection, angiogenesis and functional recovery in mouse stroke model. *PLoS One* 17: e156.

171. Lee HJ, Park IH, Kim HJ, Kim SU (2009). Human neural stem cells overexpressing glial cell line-derived neurotrophic factor in experimental cerebral hemorrhage. *Gene Ther* 16: 1066-1076.
172. Lee HJ, Lim IJ, Lee MC, Kim SU (2010). Human neural stem cells genetically modified to overexpress brain-derived neurotrophic factor promote functional recovery and neuroprotection in a mouse stroke model. *J Neurosci Res* 15: 3282-3294.
173. Le Gros Clark WE (1940). Neuronal differentiation in implanted foetal cortical tissue. *J Neurol Psychiatr* 3: 263-284.
174. Le Gros Clark WE (1942). The problem of neuronal regeneration in the central nervous system. I. The influence of spinal ganglia and nerve fragments grafted in the brain. *J Anat* 77: 20-48.
175. Leker RR, Soldner F, Velasco I, Gavin DK, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD (2007). Long-lasting regeneration after ischemia in the cerebral cortex. *Stroke* 38: 153-161.
176. Lemkine GF, Raj A, Alfama G, Turque N, Hassani Z, Alegria-Prévet O, Samarut J, Levi G, Demeneix BA (2005). Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. *FASEB* 19: 863-865.
177. Leone DP, Srinivasan K, Chen B, Alcamo E, McConnell SK (2008). The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol* 18: 28-35.
178. Li XJ, Zhang X, Johnson MA, Wang ZB, Lavaute T, Zhang SC (2009). Coordination of sonic hedgehog and Wnt signaling determines ventral and dorsal telencephalic neuron types from human embryonic stem cells. *Development* 136: 4055-4063.
179. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2000). Noggin antagonizes BMP signalling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28: 713-726.
180. Lin CS, Nicolelis MA, Schneider JS, Chapin JK (1990). A major direct GABAergic pathway from zona incerta to neocortex. *Science* 248: 1553-6.

181. Lindvall O (1989). Transplantation into the human brain: present status and future possibilities. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry Suppl*: 39-54.
182. Lindvall O, Brundin P, Widner H, et al (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247: 574-577.
183. Lindvall O, Blörklund A (2004). Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx* 1: 382-393.
184. Liu F, McCullough LD (2011). Middle cerebral artery occlusion model in rodents: methods and pitfalls. *J Biomed Biotechnol* 464701.
185. Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A (2005). Nonsynaptic GABA signalling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 8: 1179-1187.
186. Liu XS, Chopp M, Santra M, Hozeska-Solgot A, Zhang RL, Wang L, Teng H, Lu M, Zhang ZG (2008). Functional response to SDF1 alpha through over-expression of CXCR4 on adult subventricular zone progenitor cells. *Brain Res* 1226: 18-26.
187. Lledo PM, Alonso M, Grubb MS (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7: 179-193.
188. Lledo PM, Merkle FT, Alvarez-Buylla A (2008). Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci* 31: 392-400.
189. Lois C, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996). Chain migration of neural precursors. *Science* 271: 978-981.
190. Lu P, Wang Y, Graham L, McHale K, Gao M, Wu D, Brock J, Blesch A, Rosenzweig ES, Havton LA, Zheng B, Conner JM, Marsala M, Tuszyński MH (2012). Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury. *Cell* 150: 1264-1273.
191. Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Gritli-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL, Dudek H, McMahon AP, Fishell G (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niche. *Neuron* 39: 937-950.

192. Macklis JD (2012). Human adult olfactory bulb neurogenesis? Novelty is the best Policy. *Neuron* 74: 595-596.
193. Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405: 951-955.
194. Magavi SS, Lois C (2008). Transplanted neurons form both normal and ectopic projections in the adult brain. *Dev Neurobiol* 68: 1527-1537.
195. Masip M, Veiga A, Izpisúa Belmonte JC, Simón C (2010). Reprogramming with defined factor: from induced pluripotency to induced transdifferentiation. *Mol Hum Reprod* 16: 856-868.
196. Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC (2004). Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci* 24: 1726-1733.
197. Mc Georges AJ, Faull RLM (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29: 503-537.
198. Meinecke DL, Peters A (1987). GABA immunoreactive neurons in rat visual cortex. *J Comp Neurol* 261: 388-404.
199. Mercer A, Rönnholm H, Holmberg J, Lundh H, Heidrich J, Zachrisson O, Ossoinak A, Frisén J, Patrone C (2004). PACAP promotes neural stem cell proliferation in adult mouse brain. *J Neurosci Res* 76: 205-215.
200. Merkle FT, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 17528-17532.
201. Métin C, Vallee RB, Rakic P, Bhide PG (2008). Modes and mishaps of neuronal migration in the mammalian brain. *J Neurosci* 28: 11746-11752.
202. Ming GL, Song H (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28: 223-250.
203. Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008). Neural stem cell confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3: 265-278.
204. Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8: 427-437.

205. Montoya CP, Campbell-Hope LJ, Pemberton KD, Dunnett SB (1991). The « staircase test »: a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods* 36: 219-228.
206. Mori T, Buffo A, Götz M (2005). The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol* 69: 67-99.
207. Mountcastle VB (1957). Modality and topographic properties of single neurons in cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol* 20: 408-434.
208. Mudò G, Belluardo N, Mauro A, Fuxe K (2007). Acute intermittent nicotine treatment induces fibroblast growth factor-2 in the subventricular zone of the adult rat brain and enhances neuronal precursor cell proliferation. *Neuroscience* 145: 470-483.
209. Nakao N, Grasbon-Frodl EM, Widner H, Brundin P. DARP-32-rich zones in graft of lateral ganglionic eminence govern the extent of functional recovery in skilled paw reaching in an animal model of huntington's disease. *Neuroscience* 74: 959-970.
210. Nam SC, Kim Y, Dryanovski D, Walker A, Goings G, Woolfrey K, Kang SS, Chu C, Chenn A, Erdelyi F, Szabo G, Hockberger P, Szele FG (2007). Dynamic features of postnatal subventricular zone cell motility: a two-photon time-lapse study. *J Comp Neurol* 505: 190-208.
211. Neafsey EJ, Sievert C (1982). A second forelimb area exists in rat frontal cortex. *Brain Res* 232: 151-156.
212. Neafsey EJ, Bold EL, Haas G, Hurley-Gius KM, Quirk G, Sievert CF, Terreberry RR (1986). The organisation of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study. *Brain Res* 396: 77-96.
213. Neafsey EJ, Sørensen JC, Tønder N, Castro AJ (1989). Fetal cortical transplants into neonatal rats respond to thalamic peripheral stimulation in the adult. An electrophysiological study of single-unit activity. *Brain Res* 493: 33-40.
214. Nicholas CR, Kriegstein AR (2010). Regenerative medicine: Cell reprogramming gets direct. *Nature* 463: 1031-1032.

215. Nieto-Sampedro M, Manthrope M, Barbin G, Varon S, Cotman CW (1983). Injury induced neuronotrophic activity in adult rat brain: correlation with survival of delayed implants in the wound cavity. *J Neurosci* 3: 2219-2229.
216. Nieto-Sampedro M, Lim R, Hicklin DJ, Cotman CW (1988). Early release of glia maturation factor and acidic fibroblast growth factor after rat brain injury. *Neurosci Lett* 86: 361-365.
217. Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7: 136-144.
218. Ocbina PJ, Dizon ML, Shin L, Szele FG (2006). Doublecortin is necessary for the migration of adult subventricular zone cells from neurospheres. *Mol Cell Neurosci* 33: 126-135.
219. Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST (2006). A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* 26: 13007-13016.
220. Oka H (1980). Organisation of the cortico-caudate projections. A horseradish peroxidase study in the cat. *Exp Brain Res* 40: 203-208.
221. O'Leary DD (1989). Do cortical areas emerge from a protocortex? *Trends Neurosci* 12: 400-406.
222. Olson L, Seiger A, Stromberg I (1982). Intraocular transplantation in rodents: a detailed account of the procedure and example of its use in neurobiology with special reference to brain tissue grafting. In S. Federoff and L. Hertz (Eds.), *Advances in Cellular Neurobiology*, Vol. 4, Academic Press, New York, 407-442.
223. Ourednik J, Ourednik V, Lynch WP, Schachner M, Snyder EY (2002). Neural stem cells display an inherent mechanism for rescuing dysfunctional neurons. *Nat Biotechnol* 20: 1103-1110.
224. Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitz-Gerald CS, Sato Y, Cowan CA, Chien KR, Melton DA (2008). Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol* 26: 313-315.

225. Osakada F, Jin ZB, Hirami Y, Ikeda H, Danjyo T, Watanabe K, Sasai Y, Takahashi M (2009). In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by Small-molecule induction. *J Cell Sci* 122: 3169-3179.
226. Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, Ostermeier A, Fuentes DR, Yang TQ, Citri A, Sebastian V, Marro S, Südhof TC, Vernig M (2011). Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 476: 220-223.
227. Pennel NA, Streit WJ (1997). Colonization of neural allografts by host microglial cells: Relationship to graft neovascularization. *Cell Transplant* 6: 221-230.
228. Perea G, Araque A (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317: 1083-1086.
229. Pinaudeau C, Gaillard A, Roger M (2000). Stage of specification of the spinal cord and tectal projections from cortical grafts. *Eur J Neurosci* 12: 2486-2496.
230. Plumet J, Cadusseau J, Roger M (1990). Fetal cortical transplants reduce motor deficits resulting from neonatal damage to the rat's frontal cortex. *Neurosci Lett* 109: 102-106.
231. Plumet J, Ebrahimi A, Guitet J, Roger M (1993). Partial recovery of skilled forelimb reaching after transplantation of fetal cortical tissue in adult rats with motor cortex lesion - anatomical and functional aspects. *Restor Neurol Neurosci* 6: 9-27.
232. Ponti G, Crociara P, Armentano M, Bonfanti L (2010). Adult neurogenesis without germinal layers: the « atypical » cerebellum of rabbits. *Arch Ital Biol* 148: 147-158.
233. Pronichev IV, Lenkov DN (1998). Functional mapping of the motor cortex of the white mouse by a microstimulation method. *Neurosci Behav Physiol* 28: 80-85.
234. Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzales-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodriguez R, Berger MS, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol* 494: 415-434.

235. Rakic P (1988). Specification of cortical areas. *Science*. 241: 170-176.
236. Rakic P, Lombroso PJ (1998). Development of the cerebral cortex: I. Forming the cortical structure. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 37: 116-117.
237. Rakic P, Ayoub AE, Breunig JJ, Dominguez MH (2009). Decision by division : making cortical maps. *Trends Neurosci* 32: 291-301.
238. Ramaswamy S, Goings GE, Soderstrom KE, Szele FG, Kozlowski DA (2005). Cellular proliferation and migration following a controlled cortical impact in the mouse. *Brain Res* 1053: 38-53.
239. Ramon y Cajal S (1928). Degeneration and regeneration of the central nervous system. New York: Hafner.
240. Raymond LA, André VM, Cepeda C, Gladding CM, Milnerwood AJ, Levine MS. Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependant alterations in synaptic and receptor function. *Neuroscience* 198: 252-273.
241. Reiner A, Hart NM, Lei W, Deng Y (2010). Corticostriatal projection neurons – dichotomous types and dichotomous functions. *Front Neuroanat* 4: 142.
242. Reynolds BA, Weiss S (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707-1710.
243. Riolobos AS, Heredia M, de la Fuente JA, Criado JM, Yajeya J, Campos J, Santacana M (2001). Functional recovery of skilled forelimb use in rats obliged to use the impaired limb after grafting of the frontal cortex lesion with homotopic fetal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 75: 274-292.
244. Robin AM, Zhang ZG, Wang L, Zhang RL, Katakowski M, Zhang L, Wang Y, Zhang C, Chopp M (2006). Stromal cell-derived factor 1alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 125-134.
245. Rodriguez-Pallares J, Joglar B, Mu oz-Manchado AB, Villadiego J, Toledo-Aral JJ, Labandeira-Garcia JL (2012). Cografting of carotid body cells improves the long-term survival, fiber outgrowth and functional effects of grafted dopaminergic neurons. *Regen Med* 7: 309-322.

246. Romero-Grimaldi C, Moreno-López B, Estrada C (2008). Age-dependant effect of nitric oxide on subventricular zone and olfactory bulb neural precursor proliferation. *J Comp Neurol* 506: 339-346.
247. Roger M, Ebrahimi-Gaillard A (1994). Anatomical and functional characteristics of fetal neocortex transplanted into the neocortex of newborn or adult rats. *Rev Neurosci* 5: 11-26.
248. Saghatelyan A, de Chevigny A, Schachner M, Lledo PM (2004). Tenascin-R mediates activity-dependant recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7: 347-356.
249. Saha B, Jaber M, Gaillard A (2012). Potentials of endogenous neural stem cells in cortical repair. *Front Cell Neurosci* 6 : 14.
250. Salin P, Chesselet MF (1992). Paradoxical increase in striatal neuropeptide gene expression following ischemic lesions of the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9954-9958.
251. Salman H, Gosh P, Kernie SG (2004). Subventricular zone neural stem cells remodel the brain following traumatic injury in adult mice. *J Neurotrauma* 21: 283-292.
252. Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel García-Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427: 740-744.
253. Sanai N, Berger MS, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2007). Comment on « Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via lateral ventricular extension ». *Science* 318: 393.
254. Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, Wong M, Gupta N, Berger MS, Huang E, García-Verdugo JM, Rowitch Dh, Alvarez-Buylla A (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478: 382-386.
255. Sandor R, Gonzales MF, Moseley M, Sharp FR (1991). Motor deficits are produced by removing some cortical transplants grafted into injured sensorimotor cortex of neonatal rats. *J Neural Transplant Plast* 2: 221-233.

256. Santos-Torres J, Heredia M, Riolobos AS, Jimenez-Díaz L, Gómez-Bautista V, de la Fuente A, Criado JM, Navarr-López J, Yajeya J (2009). Electrophysiological and synaptic characterization of transplanted neurons in adult rat motor cortex. *J Neurotrauma* 26: 1593-1607.
257. Sauvageot CM, Stiles CD (2002). Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr opin Neurobiol* 12: 244-249.
258. Schlaggar BL, O'Leary DD (1991). Potential of visual cortex to develop an array of functional units unique to somatosensory cortex. *Science* 252: 1556-1560.
259. Schulz MK, Hogan TP, Castro AJ (1993). Connectivity of fetal neocortical block transplants in the excitotoxically ablated cortex of adult rats. *Exp Brain Res* 96: 480-486.
260. Selemon LD, Goldmann-Rakic PS (1985). Longitudinal topography and interdigitation of corticostriatal projections in the rhesus monkey. *J Neurosci* 5: 776-794.
261. Senatorov VV, Obuhova GP, Fülöp Z (1991). Electrophysiological and morphological properties of embryonic neocortical grafts developing in different regions of the host rat brain. *J Neural Transplant Plast* 2: 125-140.
262. Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S (2004). Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304: 1338-1340.
263. Shi Y, Kirwan P, Smith J, Robinson HP, Livesey FJ (2012). Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat Neurosci* 15: 477-486.
264. Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S (2003). Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299: 117-120.
265. Silver J, Miller JH (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5: 146-156.
266. Sköld MK, von Gertten C, Sandberg-Nordqvist AC, Mathiesen T, Holmin S (2005). VEGF and VEGF receptor expression after experimental brain contusion in rat. *J Neurotrauma* 22: 353-367.

267. Smart IH (1976). A pilot study of cell production by the ganglionic eminences of the developing mouse brain. *J. Anat.* 12:71-84.
268. Snappy M, Lemasson M, Brill MS, Blais M, Massouh M, Ninkovic J, Gravel C, Berthod F, Götz M, Barker PA, Parent PA, Saghatelian A (2009). Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 29: 4172-4188.
269. Sofroniew MV, Isacson O, Björklund A (1986). Cortical grafts prevent atrophy of cholinergic basal nucleus neurons induced by excitotoxic cortical damage. *Brain Res* 378: 409-415.
270. Soleman S, Yip P, Leisure JL, Moon L (2010). Sustained sensorimotor impairments after endothelin-1 induced focal cerebral ischemia (stroke) in aged rats. *Exp Neurol* 222: 13-24.
271. Song WJ, Murakami F (1998). Development of functional topography in the corticorubral projection : An in vivo assessment using synaptic potentials recorded from foetal and newborn cats. *J Neurosci* 18: 9354-9364.
272. Sørensen JC, Castro AJ, Klausen B, Zimmer J (1992). Projections from fetal neocortical transplants placed in the frontal neocortex of newborn rats. A Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin tracing study. *Exp Brain Res* 92: 299-309.
273. Sørensen JC, Grabowski M, Zimmer J, Johansson BB (1996). Fetal neocortical tissue blocks implanted in brain infarcts of adult rats interconnect with the host brain. *Exp Neurol* 138: 227-235.
274. Stanfield BB, O'Leary DDM (1985). Fetal occipital neurons transplanted to the rostral cortex can extend and maintain a pyramidal tract axon. *Nature*: 313: 135-137.
275. Stein DG, Palatucci C, Kahn D, Labbe R (1988). Temporal factors influence recovery of function after embryonic brain tissue transplants in adult rats with frontal cortex lesions. *Behav Neurosci* 102: 260-267, 325-326.
276. Stenevi U, Blörlund A, Svendgaard NA (1976). Transplantation of central and peripheral monoamine neurons in the adult rat brain: techniques and conditions for survival. *Brain Res* 114: 1-20.

277. Stoll EA, Habibi BA, Mikheev AM, Lasiene J, Massey SC, Swanson KR, Rostomily RC, Horner PJ (2011). Increased re-entry into cell cycle mitigates age-related neurogenic decline in the murine subventricular zone. *Stem Cells* 29: 2005-2017.
278. Sugar O, Gerard RW (1940). Spinal cord regeneration in the rat. *J Neurophysiol* 3: 1-19.
279. Sun J, Sun J, Ming GL, Song H (2011). Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Eur J Neurosci* 33: 1087-1093.
280. Sundholm-Peters NL, Yang HK, Goings GE, Walker AS, Szele FG (2005). Subventricular zone neuroblasts emigrate toward cortical lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 1089-1100.
281. Szele FG, Alexander C, Chesselet MF (1995). Expression of molecules associated with neuronal plasticity in the striatum after aspiration and thermocoagulatory lesions of the cerebral cortex in adult rats. *J Neurosci* 15: 4429-4448.
282. Szele FG, Chesselet MF (1996). Cortical lesion induce an increase in cell number and PSA-NCAM expression in the subventricular zone of adult rats. *J Comp Neurol* 368: 439-454.
283. Takahashi K, Yamanaka S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
284. Tanaka D Jr, Gorska T, Dutkiewicz K (1981). Corticostriate projections from the primary motor cortex in the dog. *Brain Res* 209: 287-303.
285. Tennant KA, Adkins DL, Donlan NA, Asay AL, Thomas N, Kleim JA, Jones TA (2011). The organization of the forelimb representation of the C57BL/6 mouse motor cortex as defined by intracortical microstimulation and cytoarchitecture. *Cereb Cortex* 21: 865-876.
286. Taupin P (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev* 53: 198-214.
287. Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR (2012). Combination of vascular endothelial and fibroblast growth factor 2 for

- induction of neurogenesis and angiogenesis after traumatic brain injury. *J Mol Neurosci* 47: 166-172.
288. Thompson L, Barraud P, Andersson E, Kirik D, Björklund A (2005). Identification of dopaminergic neurons of nigral and ventral tegmental area subtypes in grafts of fetal ventral mesencephalon based on cell morphology, protein expression, and efferent projections. *J Neurosci* 25: 6467-6477.
289. Thompson LH, Grealish S, Kirik D, Blörlund A (2009). Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway in the adult mouse brain. *Eur J Neurosci* 30: 625-638.
290. Thompson WG (1890). Successful brain grafting. *NY Med J* 51: 701-702.
291. Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K, Okano H (2005). Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 81: 776-788.
292. Tønnesen J, Parish CL, Sørensen AT, Andersson A, Lundberg C, Deisseroth K, Arenas E, Lindvall O, Kokaia M (2011). Functional integration of grafted neural stem cell-derived dopaminergic neurons monitored by optogenetics in an in vitro Parkinson model. *PLoS One* 6: e17560.
293. Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, Liu X, Wu H, Carmichael ST (2006). A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci* 26: 1269-1274.
294. Tuszyński MH (2007). Rebuilding the brain: resurgence of fetal grafting. *Nat Neurosci* 10: 1229-1230.
295. Vandepitte C, Taymans JM, Casteels C, Coun F, Ni Y, Van Laere K, Baekelandt V (2010). Automated quantitative gait analysis in animal models of movement disorders. *BMC Neurosci* 11: 92.
296. Veenin JG, Cornelissen FM, Lieven PA (1980). The topical organization of the afferents to the caudatoputamen of the rat. A horseradish peroxidase study. *Neuroscience* 5: 1253-1268.

297. Vierbuche T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463: 1035-1041.
298. Vierbuchen T, Wernig M (2011). Direct lineage conversions: unnatural but useful ? *Nat Biotechnol* 29: 892-907.
299. Von Monakow C (1906). Aphasie und diaschisis. *Neurol. Centralbl* 25: 1026-1038.
300. Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH, Kearns SM, Marshall GP 2nd, Scheffer B, Steindler DA (2006). Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54: 815-825.
301. Wang C, Liu F, Liu YY, Zhao CH, You Y, Wang L, Zhang J, Wei B, Ma T, Zhang Q, Zhang Y, Chen R, Song H, Yang Z (2011). Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res* 21: 1534-1550.
302. Wang T, Xiong JQ, Ren XB, Sun W (2012). The role of Nogo-A in neuroregeneration: A review. *Brain res Bull* 87: 499-503.
303. Wang Y, Jin K, Greenberg DA (2007a). Neurogenesis associated with endothelin-induced cortical infarction in the mouse. *Brain Res* 1167: 118-122.
304. Wang Y, Jin K, Mao XO, Xie L, Banwait S, Marti HH, Greenberg DA (2007b). VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration. *J Neurosci Res* 85: 740-747.
305. Wang Y, Bontempi B, Hong SM, Mehta K, Weinstein PR, Abrams GM, Liu J (2008). A comprehensive analysis of gait impairment after experimental stroke and the therapeutic effect of environmental enrichment in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 1936-1950.
306. Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A, Katayama T, Nozaki S, Kawasaki H, Watanabe Y, Mizuseki K, Sasai Y (2005). Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci* 8: 288-296.
307. Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16: 7599-7609.

308. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlung E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5856-5861.
309. Whitman MC, Fan W, Rela L, Rodriguez Gil D, Greer CA (2009). Blood vessels form a migratory scaffold in the rostral migratory Stream. *J Comp Neurol* 516: 94-104.
310. Whitman MC, Greer CA (2009). Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol* 89: 162-175.
311. Wiesendanger R, Wiesendanger M (1982). The corticopontine system in the rat. II. The projection pattern. *J Comp Neurol* 208: 227-238.
312. Wilby MJ, Sinclair SR, Muir EM, Zietmow R, Adcock KH, Horellou P, Rogers JH, Dunnett SB, Fawcett JW (1999). A glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting clone of the Schwann cell line SCTM41 enhances survival and fiber outgrowth from embryonic nigral neurons grafted to the striatum and to the lesioned substantia nigra. *J Neurosci* 19: 2301-2312.
313. Wilson SI, Edlund T (2001). Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat Neurosci* 4: 1161-1168.
314. Wilson SW, Houart C (2004). Early steps in the development of the forebrain. *Dev Cell* 6: 167-181.
315. Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG (2002). Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16: 1681-1689.
316. Winner B, Kohl Z, Gage FH (2011). Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33: 1139-1151.
317. Wonders CP, Anderson SA (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci* 7: 687-696.
318. Wu W, Wong K, Chen J, Jiang Z, Dupuis S, Wu JY, Rao Y (1999). Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein slit. *Nature* 400: 331-336.

319. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M (2010). Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. *Curr Opin Investig Drugs* 11: 298-308.
320. Xu Q, De La Cruz E, Rubenstein JI, Anderson SA (2004). Origins of cortical interneurons subtypes. *J Neurosci* 24: 2612-2622.
321. Young CC, Brooks KJ, Buchan AM, Szele FG (2011). Cellular and molecular determinants of stroke-induced changes in subventricular zone cell migration. *Antioxid Redox Signal* 14: 1877-1888.
322. Yu X, Zecevic N (2011). Dorsal radial glial cells have the potential to generate cortical interneurons in human but not in mouse brain. *J Neurosci* 31: 2413-2420.
323. Zaman V, Shetty AK (2002). Combined neurotrophic supplementation and caspase inhibition enhances survival of fetal hippocampal CA3 cell grafts in lesioned CA3 region of the aging hippocampus. *Neuroscience* 109: 537-553.
324. Zeng H, Guo M, Martins-Taylor K, Wang X, Zhang Z, Park JW, Zhan S, Kronenberg MS, Lichtler A, Liu HX, Chen FP, Yue L, Li XJ, Xu RH (2010). Specification of region-specific neurons including forebrain glutamatergic neurons from induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 5: e11853.
325. Zhang J, Giesert F, Kloos K, Vogt Weisenhorn DM, Aigner L, Wurst W, Couillard-Despres S (2010). A powerful transgenic tool for fate mapping and functional analysis of newly generated neurons. *BMC Neurosci* 31: 11-158.
326. Zhang P, Li J, Liu Y, Chen X, Lu H, Kang Q, Li W, Gao M (2011). Human embryonic neural stem cell transplantation increases subventricular zone cell proliferation and promotes peri-infarct angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Neuropathology* 31: 384-391.
327. Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, Chopp M (2001). Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 105: 33-41.
328. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4: 381-384.

329. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455: 627-632.

Evaluation du potentiel thérapeutique des stratégies de remplacement cellulaire dans un modèle de lésion corticale chez la souris : transplantation neuronale et mobilisation des cellules souches endogènes

Les lésions cérébrales induisent une mort neuronale associée à des déficits fonctionnels importants. Afin de pallier aux capacités limitées de régénération spontanée des neurones du système nerveux central adulte, nous avons évalué, dans un modèle de lésion par aspiration du cortex moteur chez la souris adulte, le potentiel de stratégies de remplacement cellulaire par la transplantation de neurones embryonnaires ou dérivés de cellules souches, et la mobilisation des cellules souches endogènes présentes dans la zone sous-ventriculaire (ZSV). L'efficacité des neurones greffés dépend de leur capacité à adopter un phénotype neuronal approprié et à établir des projections spécifiques vers l'hôte. Nous avons montré que les cellules embryonnaires transplantées immédiatement après la lésion dans le cortex moteur lésé se différencient en neurones matures corticaux et envoient des projections appropriées vers les cibles du cortex moteur. Nous avons montré qu'introduire un délai d'une semaine entre la lésion du cortex moteur et la transplantation augmente la vascularisation et la prolifération des cellules transplantées, ainsi que la densité des projections qu'elles développent. Par ailleurs, nous avons étudié la possibilité de générer des neurones corticaux à partir de cellules souches humaines comme source alternative de neurones à transplanter. Enfin, nous avons montré que la lésion du cortex moteur induit une augmentation de la prolifération cellulaire et de la neurogenèse dans la ZSV, et favorise la migration des neuroblastes de la ZSV vers le site de lésion.

Mots-clés : lésion corticale, thérapies cellulaires, transplantation neuronale, cellules souches, zone sous-ventriculaire

Therapeutic potential of cell replacement therapies in a model of mouse cortical lesion : neuronal transplantation and mobilization of endogenous stem cells

Damage to the adult motor cortex can lead to severe deficits in motor function. One strategy for overcoming the generally limited capacity of the mature central nervous system to regenerate axons in response to cell loss is cell replacement based therapies. We studied brain repair strategies in a mouse model of motor cortex aspiration lesion by using transplantation of embryonic neurons or stem cells-derived neurons and by evaluating the potential of endogenous stem cells found in the subventricular zone. Neuronal transplantation efficacy depends on the capacity of the transplanted cells to develop into appropriate neuronal phenotype and establishment of specific connections. We have shown that embryonic cells grafted immediately after lesion into the lesioned motor cortex develop into mature neurons with appropriate phenotype and establish projections towards appropriate targets. We have shown that introducing a delay of one week between motor cortex lesion and transplantation enhances graft vascularization, grafted cells proliferation and the density of transplant-to-host projections. Besides, we have studied the possibility to generate cortical neurons from human stem cells as an alternative source of neurons for transplantation. Finally, recruitment of endogenous stem cells found in the SVZ was examined in a mouse model of cortical lesion. We have shown that motor cortex injury increases cellular proliferation and neurogenesis in the SVZ and the migration of neuroblasts near the lesion site via blood vessels and astrocytes assisted migration.

Keywords : cortical lesion, cell therapy, neuronal transplantation, stem cells, subventricular zone